

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE DE MAÎTRISE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**CÔMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES**

**PAR
KIM DESPRÉS, B. Sc. (Microbiologie)**

**CONSTRUCTION D'UN TRANSPOSON DE TYPE Tn5 POUR LA
MUTAGENÈSE CHEZ LA BACTÉRIE
*Actinobacillus pleuropneumoniae***

SEPTEMBRE 2006

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de maîtrise, le Dr Marc Sirois pour m'avoir permis de faire ma maîtrise dans son laboratoire. Merci de m'avoir permis d'acquérir de précieuses connaissances techniques et théoriques sur la génétique moléculaire bactérienne. J'aimerais aussi remercier chaleureusement Valérie Ouellet, collègue et amie. Elle a été d'un énorme soutien et d'une oreille attentive tout au long de ma première année de maîtrise. Merci aussi à Jean-François Schmouth et Vincent Roy pour avoir travaillé en parallèle de mon projet lors de mon absence. Un gros merci à Annet Lavallée pour avoir été mon rayon de soleil lors de la rédaction de mon mémoire!

Finalement, j'aimerais dire un merci spécial à ma mère, qui m'a permis de continuer ma maîtrise en gardant mes adorables jumelles. J'en profite aussi pour souligner l'appui de mon conjoint ainsi que de mes beaux-parents. Ils ont toujours été derrière moi pour me soutenir et m'encourager tout au long de ma maîtrise.

RÉSUMÉ

Actinobacillus pleuropneumoniae est l'agent causal de la pleuropneumonie porcine. Cette maladie est répandue à travers le monde et cause d'importantes pertes économiques aux producteurs. La pleuropneumonie est hautement contagieuse et provoque des lésions pulmonaires importantes. Elle demeure toutefois difficile à éradiquer puisqu'il n'existe présentement aucun vaccin efficace contre tous les sérotypes. En plus d'être multifactorielle, la virulence d'*A. pleuropneumoniae* n'est pas complètement élucidée. Pour contrer cette maladie, il est primordial d'identifier de nouveaux facteurs de virulence afin de fabriquer de nouveaux vaccins. Dans cette étude, nous avons fabriqué un transposon de type Tn5 afin d'utiliser la technique de mutagenèse aléatoire par transposition. Un gène de résistance à la tétracycline chromosomique d'*A. pleuropneumoniae* a été inséré à l'intérieur d'un transposon et ce dernier a été incorporé par électroporation sous forme d'un complexe transposon-transposase à l'intérieur de cellules bactériennes afin d'obtenir des clones résistants. Les résultats ont permis de démontrer l'efficacité de ce nouveau transposon chez *A. pleuropneumoniae* ainsi que chez *E. coli*. Une banque de mutants est présentement en construction dans notre laboratoire. Par ailleurs, d'autres analyses parallèles sont présentement en cours dans la compagnie de biotechnologie américaine Epicentre Inc. afin d'obtenir différentes informations sur le transposome TnTet^CNew.

Mots clés : *Actinobacillus pleuropneumoniae*, pleuropneumonie, facteurs de virulences, transposome, immunogène, antigène.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	II
RÉSUMÉ.....	III
TABLE DES MATIÈRES	IV
LISTE DES TABLEAUX.....	VI
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....	VIII
CHAPITRE I INTRODUCTION	1
1.1 La production porcine	1
1.2 Historique.....	1
1.3 Classification.....	2
1.4 Pathogenèse.....	2
1.5 Protection et Traitement.....	3
CHAPITRE II FACTEURS DE VIRULENCE	5
2.1 Les toxines RTX	5
2.2 Capsule.....	8
2.3 Lipopolysaccharides.....	10
2.4 Protéines de la membrane externe (OMP)	11
2.4.1 Systèmes d'acquisition du fer	12
2.5 Fimbriae	13
2.6 Protéases sécrétées	14
2.7 Superoxydes dismutases.....	14
2.8 Uréase.....	15
CHAPITRE III LA TRANSPOSITION POUR L'IDENTIFICATION DE FACTEURS DE VIRULENCE.....	17
3.1 La transposition.....	17
3.2 La Signature-tag mutagenesis (STM)	20
3.3 Le transposome	22

CHAPITRE IV PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	25
4.1 Problématique de recherche	25
4.2 Hypothèses et objectifs de recherche	25
CHAPITRE V MATÉRIEL ET MÉTHODES	27
5.1 Souches utilisées et conditions de croissance	27
5.2 Identification des gènes de résistances efficaces	27
5.3 Isolation de l'ADN.....	27
5.4 Préparation des vecteurs.....	28
5.5 Amplification des gènes de résistance	28
5.6 Clonage des gènes de résistance	29
5.7 Préparation des transposons	31
5.8 Préparation des transposomes	32
5.9 Tests de transposition <i>in vitro</i>	32
5.10 Construction d'une banque de mutants	33
5.11 Analyses génétiques et bio-informatique	33
CHAPITRE VI RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	34
6.1 Transposon TnCl ^P	34
6.2 Transposon TnTet ^P	35
6.3 Transposon TnTet ^C	36
6.4 Banque de clones.....	38
CHAPITRE VII CONCLUSION GÉNÉRALE	39
7.1 Le transposome en relation avec les facteurs de virulence	39
7.2 Le transposon Chlr ^p	40
7.3 Le transposon Tet ^p	40
7.4 Le transposon Tet ^c	41
7.5 Perspectives d'avenir	41
BIBLIOGRAPHIE.....	42

LISTE DES TABLEAUX

I Organisation des gènes <i>apxI</i> à IV et distribution des toxines ApxI à IV à travers les sérotypes.....	7
II Gènes codant pour des facteurs de virulence potentiels chez <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	16

LISTE DES FIGURES

2.1 Organisation des gènes C, A, B et D de l'opéron <i>apxI</i>	6
2.2 Organisation des gènes de l'opéron <i>cps5ABCD</i>	9
2.3 Organisation des gènes de l'opéron <i>cpxDCBA</i>	10
2.4 Structure d'un lipopolysaccharide.....	11
2.5 Organisation des gènes <i>tonB</i> , <i>exbB</i> , <i>exbD</i> , <i>tbpB</i> et <i>tbpA</i>	12
3.1 Modèle de transposition.....	17
3.2 Modèle de transposon composé.....	18
3.3 Modèle de la technique de mutagenèse par STM.....	22
3.4 Fabrication d'un complexe transposome.....	23
5.1 Figure du vecteur pMOD-2<MCS> et pMOD-3 R6K γ ori.....	30
6.1 Séquence du transposon dans pMOD-2<MCS>/chl _r	35
6.2 Photo d'un PCR effectué sur l'ADN génomique d'APP 4074 avec les amorces pour amplifier le gène de résistance à la tétracycline.....	37
6.3 Schéma du transposon TnTet ^C New.....	38

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

kDa	kilo Dalton
pb	paires de bases
Mb	mégabase
µg	microgrammes
µl	microlitres
µM	micromolaire
rpm	rotations par minute
V	Volts
kV	kiloVolts
ADN	acide désoxyribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messager
ATP	adénosine triphosphate
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
ORF	cadre de lecture ouvert
App	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
β-NAD	bêta-nicotinamide adénine dinucléotides
LPS	lipopolysaccharide
RTX	repeats in the structural toxin
CP	polysaccharides capsulaire
OMP	proteins de la membrane externe
ABC	ATP binding cassette
Tbps	protéines liant la transferrine

IgG	immunoglobuline de type G
IgA	immunoglobuline de type A
Mg ²⁺	magnésium
Tn	transposon
IS	séquences d'insertion
IR	répétitions inversées
STM	signature tag mutagenesis
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
Nal ^R	résistance à l'acide nalidixique
TSA	tryptic soy agar
TSB	tryptic soy broth
LB	Luri-Bertani
EDTA	Acide éthylènediaminotétraacétique

CHAPITRE I INTRODUCTION

1.1 La production porcine

L'élevage porcin connaît une augmentation considérable depuis quelques années. En effet, il se classe présentement au deuxième rang à l'échelle mondiale tant sur le plan de la production que de la consommation. À titre d'exemple, le commerce international des viandes de porc est passé de 1 700 000 tonnes (poids carcasse) en 1993 à 3 570 000 tonnes en 2001 [1]. Au Québec, en l'an 2000, on comptait près de 3000 entreprises porcines et des recettes monétaires agricoles d'un milliard de dollars [1].

Par ailleurs, cette industrie subie des pertes substantielles chaque année à cause de certains pathogènes du porc. Parmi ceux-ci, on retrouve la bactérie *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) qui est l'agent causal de la pleuropneumonie porcine. On estime à plus de 48.5 % le nombre d'éleveurs des États-Unis qui ont été confrontés à cette maladie [2]. Au Canada, les pertes directes (mortalité qui peut atteindre 10 % ou plus) ou indirectes (coût du traitement, ralentissement de la croissance, etc.) résultantes de cette maladie sont estimées à 40 millions de dollars par an [2].

1.2 Historique

Les premières observations d'App ont été faites par Pattison *et al.* en 1957, à partir de lésions de pleuropneumonie porcine [2, 3, 4]. Elle fut tout d'abord nommée *Haemophilus-like* avant d'être inscrite sur la liste officielle des dénominations bactériennes sous le nom de *Haemophilus pleuropneumoniae*. En 1978, Bertschinger et Seifert ont étudié des cas de pleuropneumonie causés par une bactérie non exigeante en β -nicotinamide adénine dinucléotides (β -NAD) ressemblant à *Mannheimia haemolytica* et appelée *Pasteurella haemolytica-like* ou souche BS [2, 5, 6]. Par hybridation ADN-ADN, il a été démontré que *Haemophilus pleuropneumoniae* et *Pasteurella haemolytica-like* étaient de la même espèce (90% d'homologie) et que *H. pleuropneumoniae* était beaucoup plus apparentée à *Actinobacillus lignieresii* qu'à

Haemophilus (80% d'homologie) [2, 7]. Grâce à ces observations, l'espèce *Actinobacillus pleuropneumoniae* fut créée.

1.3 Classification

App est une bactérie Gram négative qui fait partie de la famille des *Pasteurellaceae* avec les genres *Haemophilus*, *Mannheimia* et *Pasteurella*. C'est une bactérie encapsulée qui possède une morphologie coccobacillaire et qui peut être observée seule ou regroupée en chaîne [4, 7, 9].

App se divise en deux biotypes, dépendant ou indépendant du NAD, aussi appelé facteur V [9]. Chaque biotype est ensuite divisé en sérotypes en se basant sur les différences entre les polysaccharides capsulaires et les lipopolysaccharides (LPS) [4, 9]. Le biotype I (NAD dépendant) comprend donc les sérotypes 1 à 12 ainsi que le sérotype 15. Les sérotypes 1 et 5 sont divisés en sous-types 1A, 1B, 5A et 5B à cause de différences mineures dans la structure des lipopolysaccharides de la membrane externe [12]. Le biotype II (NAD indépendant), quant à lui, comprend les sérotypes 13 et 14. Il semble moins virulent que le biotype I [13]. La prévalence des sérotypes varie d'une région à une autre et peut varier dans le temps pour une région donnée. Par exemple, au Canada, les sérotypes 1, 5 et 7 sont les plus répandus tandis qu'en Europe les sérotypes 2, 9 et 11 prédominent. Par contre, la présence d'autres sérotypes n'est pas exclue mais est plutôt minoritaire et sporadique [14].

1.4 Pathogenèse

La pleuropneumonie porcine se transmet principalement par contact direct entre deux animaux ou via de fines gouttelettes en aérosols [2, 11]. Seuls les porcs peuvent être infectés par App. Par conséquent, la durée de vie de cette bactérie dans l'environnement est limitée. En effet, à moins d'être contenue dans des gouttelettes ou du mucus, App ne survie que quelques heures [2, 4, 12]. Lorsqu'elle est inhalée, App va d'abord coloniser le tractus respiratoire supérieur (cavité nasale, amygdales, trachée, etc.) et ensuite, le tractus inférieur (lobes pulmonaires, alvéoles, etc.) de l'hôte. Seul la colonisation des voies respiratoires inférieures entraîne l'apparition de la maladie [12].

S'il y a uniquement les voies respiratoires supérieures qui sont colonisées, il peut y avoir des porteurs de la bactérie qui ne démontrent aucun signe clinique.

Cette maladie est facilement diagnostiquée par les signes cliniques et les lésions pulmonaires qui apparaissent après une incubation de 24 à 48 heures. En effet, elle se caractérise par une nécrose hémorragique des poumons et une pleurésie fibrineuse [10].

De plus, la maladie peut évoluer selon trois modes : suraiguë, aiguë et chronique. Lors d'une infection suraiguë, les principaux signes sont de l'hyperthermie (41 à 42°C), de l'abattement, de l'anorexie [2, 4, 12]. Par la suite, les porcs souffrent de diarrhée, de vomissements et de dyspnée. Le taux de mortalité se situe entre 15 et 40 % et dépend de la virulence de la souche, de la densité de l'inoculum, des conditions d'élevage et du statut immunitaire des animaux [2]. La forme aiguë, quant à elle, présente une évolution moins rapide et peut déboucher sur une forme chronique. Les animaux sont abattus, sans appétit, et présentent un syndrome respiratoire grave avec dyspnée et toux [11]. L'évolution clinique est très variable d'un animal à un autre et les porcs qui survivent demeurent porteurs et excréteurs de germes. Toutes les catégories d'âges sont sensibles à App mais les jeunes porcs sont plus susceptibles à l'infection. Par contre, il est important de noter que le diagnostic peut être faussé puisque *Actinobacillus suis* peut causer des lésions semblables à celles causées par App [14].

1.5 Protection et Traitement

Lorsque détectée dans la phase initiale de la maladie, l'infection à App peut être traitée par des antibiotiques tels que la pénicilline, le chloramphénicol et quelques tétracyclines [14]. Par contre, il est important de choisir le traitement antibiotique d'après l'antibiogramme car des résistances acquises ont été notées. Ces résistances sont habituellement associées à la présence de plasmides ou de transposons conjugatifs [2, 14].

De nombreux travaux ont été consacrés à la vaccination mais plusieurs problèmes restent à résoudre avant d'obtenir le vaccin idéal [8]. En effet, les mécanismes immunitaires responsables de la protection ne sont pas parfaitement

élucidés. De plus, les facteurs de virulence d'App sont nombreux ce qui complique la mise au point de vaccins sous-unitaires parfaitement efficaces [2, 9]. Par ailleurs, les vaccins contre App produits commercialement sont principalement composés de cellules entières inactivées chimiquement et possèdent une efficacité limitée aux sérotypes utilisés dans la fabrication du vaccin [2]. Ils permettent toutefois de réduire l'intensité des signes cliniques, le taux de mortalité, les retards de croissance et le coût des traitements mais l'efficacité est insuffisante pour prévenir l'infection. Un autre type de vaccin est présentement en développement. Il consiste à utiliser une combinaison de sous-unités impliquées dans la virulence telles que les toxines RTX et les protéines de membrane afin d'activer les cellules de l'immunité chez le porc. Ce type de vaccin est généralement efficace contre tous les sérotypes [15]. Il est donc important d'identifier de nouveaux facteurs de virulence afin de mieux comprendre les mécanismes d'infection utilisés par App et permettre le développement éventuel de vaccins sous-unitaires.

CHAPITRE II

FACTEURS DE VIRULENCE

La pathogénicité d'App est causée par une combinaison de facteurs de virulence. La section suivante fait un bref résumé des principaux facteurs connus ainsi que des facteurs potentiels. Voir le tableau II à la fin de cette section pour un résumé du chapitre.

2.1 Les toxines RTX

Avec leur activité cytotoxique, la famille des toxines RTX (**R**epeats in the structural **T**oxin) est un des plus importants facteurs de virulence. Elles sont sécrétées par une variété de bactéries Gram négative dont App et *E. coli*. Quatre exotoxines sont produites par App, soit ApxI à ApxIV (*Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX toxins) [16]. ApxI et ApxII possèdent une activité hémolytique et cytotoxique tandis qu'ApxIII ne possède qu'une activité cytotoxique pour les cellules endothéliales, les macrophages broncho-alvéolaires et les neutrophiles [2]. ApxIV serait, quant à elle, impliquée dans l'invasion des tissus de l'hôte [16].

De plus, plusieurs études ont démontré qu'ApxI est plus hémolytique et cytotoxique que les autres toxines [16, 17, 19]. C'est pour cette raison que les sérotypes 1a-1b-5a-5b-9-10-11, qui sécrètent cette toxine, sont plus virulents. Par ailleurs, la plupart des sérotypes sécrètent plutôt une combinaison de toxines (voir tableau I). C'est cette combinaison de toxines qui ferait varier le degré de virulence des sérotypes. Par exemple, les sérotypes 1-5-9-11 sécrètent les toxines I et II et sont plus virulents. Les sérotypes 2-4-6-8 sécrètent les toxines II et III mais ont une virulence plus faible. Tous les sérotypes produisent la toxine ApxIV, mais son expression est exclusivement *in vivo* [9, 16]. En effet, le produit du gène *apxIVA* n'a pu être détecté dans les cultures *in vitro* d'App, mais les anticorps de porcs infectés expérimentalement avec les sérotypes 1, 5 et 7 ont tous réagit au recombinant ApxIVA [20].

Chez App, les toxines ont la capacité d'induire la formation de pores chez les cellules du porc en s'insérant dans leurs membranes [2]. De plus, elles contribuent à l'invasion d'App par l'expression de propriétés antiphagocitaires [9]. Par ailleurs, elles n'ont pas toutes la même activité et le même degré de virulence. À forte dose, ces toxines stimulent, dans un premier temps, la production des radicaux oxygénés par les macrophages alvéolaires et les neutrophiles puis, dans un deuxième temps, elles forment des pores dans la membrane des phagocytes (et d'autres cellules cibles) provoquant une différence de pression osmotique qui permet l'entrée d'eau, un gonflement puis un éclatement des cellules [18, 19]. Les phagocytes sont tués d'autant plus vite que la concentration en toxines est élevée. À faible dose, ces toxines provoquent une altération morphologique (gonflement réversible après élimination de la toxine) des macrophages alvéolaires, une perte de leur propriété chimiotactique, une perte de leur propriété d'adhérence et une diminution de la phagocytose [2].

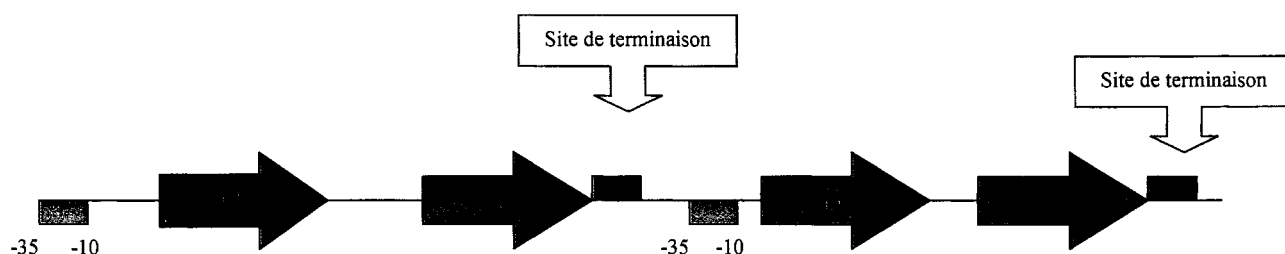
























FIGURE 2.1 : Organisation des gènes C, A, B et D de l'opéron *apxI* selon Jensen et *al.* [17]

Ces toxines sont codées par des opérons constitués de quatre gènes : C, A, B et D (voir figure 2.1) [17]. Le gène C code pour une protéine nécessaire à l'activation de la toxine. Le gène A code, quant à lui, pour la protéine structurale ou prétoxine. Les gènes B et D produisent des protéines essentielles à la sécrétion des toxines. La présence d'une région promotrice et d'une région d'arrêt de la transcription en amont des gènes *apxIC* et *apxIB* indiquent plusieurs transcrits possibles; un ARNm composé du transcrit des gènes *apxICA* inductible par le calcium et un deuxième, composé du transcrit des gènes *apxICABD* [18].

Tableau I
Organisation des gènes *apxI* à IV et distribution des toxines ApxI à IV à travers les sérotypes

Sérotypes	Gènes impliqués				Toxines sécrétées
	<i>apxI</i>	<i>apxII</i>	<i>apxIII</i>	<i>apxIV</i>	
1, 5, 9, 11					ApxI, ApxII et ApxIV
10					ApxI et ApxIV
2, 4, 6, 8					ApxII, ApxIII et ApxIV
7, 12, 13					ApxII et ApxIV
3					ApxII, ApxIII et ApxIV
14					ApxI, ApxII et ApxIV
15					ApxII, ApxIII et ApxIV

Note : Pour les sérotypes 2, 4, 6, 7, 8, 12, 13 et 15 l'opéron *apxI* est tronqué pour les gènes C et A. Pour *apxII*, on retrouve un court segment qui ressemble à l'extrémité 5' du gène B, d'où ΔB [19].

L'organisation des quatre gènes des opérons des différentes toxines est caractéristique des toxines RTX et est représentée par l'organisation *apxICABD*. Par exemple, *apxI* est composé des quatre gènes C, A, B et D sauf pour les sérotypes 2, 4, 6, 7, 8, 12, 13 et 15 où l'opéron est tronqué pour les gènes C et A. Pour ces sérotypes, il n'y a donc pas production de la prétoxine et de l'activateur. Chez *apxII*, l'opéron n'est constitué que des gènes C et A. L'analyse de l'opéron a aussi démontré la présence, en aval, d'une courte séquence non-fonctionnelle ressemblant à l'extrémité 5' du gène B (ΔB). La toxine ApxII doit donc utiliser les gènes *apxIB* et *apxID* afin d'être sécrétée. L'opéron *apxIII* possède, lui aussi, les quatre gènes nécessaires à la production et à la sécrétion de la toxine [19]. La toxine ApxIV, quant à elle, est produite par un opéron ne contenant que le gène *apxIVA*. En amont de ce gène, on retrouve un cadre de lecture ouvert (ORF1) qui produit une protéine de 157 acides aminés nécessaire à l'activité d'ApxIV [20].

2.2 Capsule

La capsule d'App serait un autre facteur très important pour la virulence de la bactérie. Elle ne possède pas d'activité biologique à elle seule mais elle procure une barrière contre les défenses humorales de l'hôte et prévient la phagocytose par les macrophages alvéolaires [9]. De plus, elle inhiberait l'activation de la voie du complément et permettrait d'augmenter la résistance aux sérums bactéricides [21].

C'est la capsule qui permettrait, avec les lipopolysaccharides (LPS), d'identifier les sérotypes. En effet, elle permettrait de séparer les sérotypes en trois groupes différents selon sa constitution en sucres et oligosaccharides. Ces différences de structures ainsi que la quantité de matériel capsulaire pourraient expliquer les variations de virulence notées entre les sérotypes [2]. Par ailleurs, puisque le matériel capsulaire permet de séparer les sérotypes, les anticorps anti-capsule sont spécifiques aux souches qui possèdent les mêmes antigènes sur leur capsule.

Deux opérons sont impliqués dans la formation de la capsule. Tout d'abord, la biosynthèse des polysaccharides capsulaires (CP) est régulée par l'opéron *cps5ABCD*

(*cps5* pour Capsular Polysaccharide Synthesis serotype 5). Le séquençage de cet opéron par Ward *et al.* a permis de constater la présence de deux séquences promotrices en amont des gènes *cps5A* et *cps5D* (voir figure 2.2) [22]. Il y aurait donc possibilité de deux transcrits : *cps5ABCD* pour la synthèse des CP et *cps5D* pour la synthèse des LPS [22]. Par ailleurs, le rôle de ces gènes dans la virulence d'App semble important puisque les mutants pour les gènes *cps5ABC* seraient incapables d'induire la maladie [22].

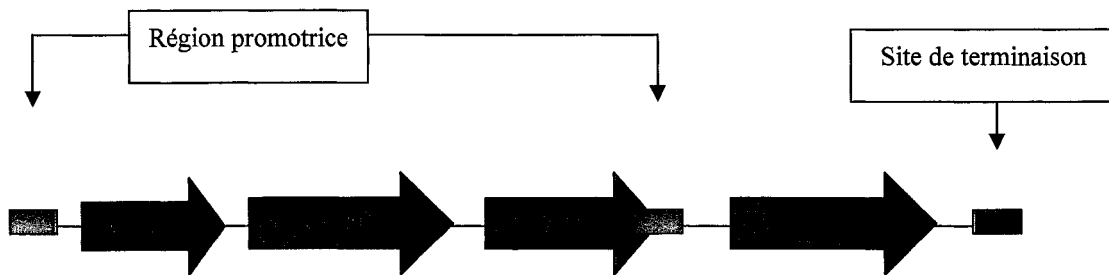


FIGURE 2.2 : Organisation des gènes de l'opéron *cps5ABCD* selon Ward *et al.*[22]

L'exportation des CP se fait, quant à elle, grâce à l'opéron *cpxDCBA* (*cpx* pour Capsular Polysaccharide export). D'après les séquences déduites d'acides aminés, les protéines CpxC, CpxB et CpxA feraient partie de la famille des transporteurs ABC utilisant l'ATP (adénosine triphosphates) comme source d'énergie (voir figure 2.3) [23]. CpxD serait une lipoprotéine impliquée dans le transport des CP à travers la membrane externe. Les protéines d'exportation de la capsule seraient, elles aussi, importantes dans la virulence d'App. En effet, il a été démontré qu'une mutation dans le gène *cpxC* produisait un mutant acapsulé ayant une virulence réduite [24, 25].

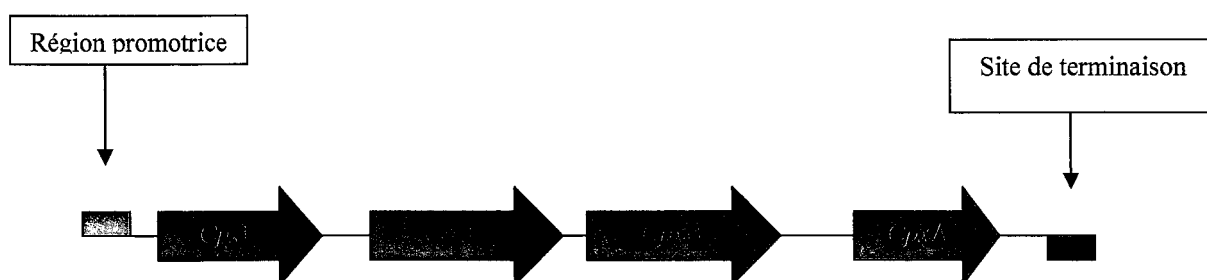


FIGURE 2.3 : Organisation des gènes de l'opéron *cpxDCBA* selon Ward et *al.* [23]

2.3 Lipopolysaccharides

Le lipopolysaccharide (LPS) est une structure que l'on retrouve seulement chez les bactéries à gram négatif. Il est constitué de trois parties distinctes : le lipide A, le polysaccharide central et l'antigène O (voir figure 2.4) [2, 25, 26]. Il a été démontré que le polysaccharide central est très conservé contrairement à l'antigène O qui varie considérablement à travers les sérotypes. C'est cette dernière structure qui permettrait, avec la structure capsulaire, la différenciation des sérotypes. La biosynthèse de l'antigène O serait régulée par quatre cadres de lecture ouverts : ORF12, ORF16, ORF17 et ORF18 [27]. Ces ORFs contiennent les gènes *rfbC* et *rfbN* qui codent pour des rhamnosyl transférases potentielles. *RfbU* et un autre gène codent pour des glycosyl transférases et *rfbP* coderait pour une undecaprenyl-phosphate galactose phosphotransférase [27].

En plus d'aider la stabilisation de la structure membranaire et de contribuer à la charge négative de la bactérie, le LPS serait impliqué dans la colonisation d'App. En effet, il permettrait l'adhérence de la bactérie aux alvéoles pulmonaires et à l'épithélium des bronchioles terminales de l'hôte [2, 9, 26]. Par ailleurs, les LPS permettraient aussi à App d'utiliser le fer contenu dans l'hémoglobine du porc. En effet, la lyse des érythrocytes (par les hémolysines) libère l'hémoglobine. Le LPS, par l'entremise du lipide A, s'y lie afin d'acquérir le fer [28]. De plus, le lipide A aurait la capacité d'agir comme endotoxine lors de la lyse des cellules bactériennes.

Les LPS agiraient comme facteur de virulence puisque des anticorps anti-LPS ont été retrouvés dans le sérum de porcs convalescents. Cependant, des essais de protection ont démontrés que l'immunité acquise est séro-spécifique, c'est-à-dire que les anticorps protègent uniquement contre des infections subséquentes causées par le même sérotype. De plus, de récentes études ont démontrées qu'une mutation dans l'antigène O n'aurait pas d'effet sur l'adhérence aux cellules respiratoires. Par contre, une mutation dans le polysaccharide central diminuerait l'adhérence [25].

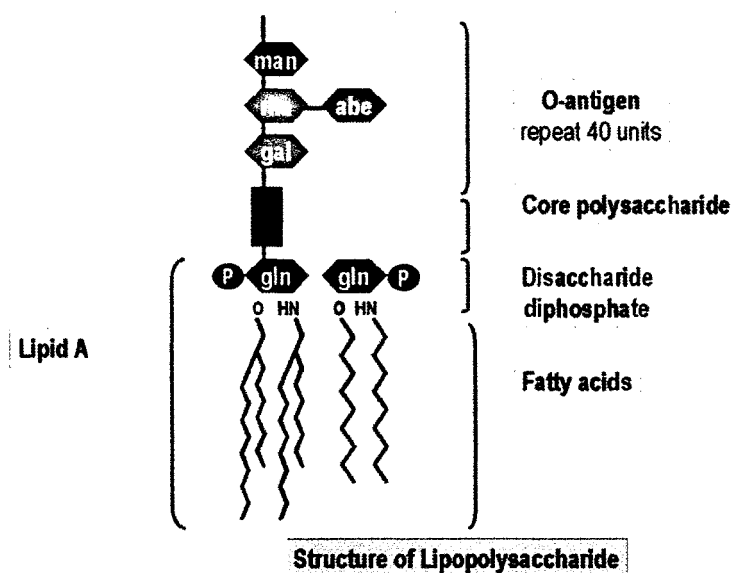


FIGURE 2.4 : Structure d'un lipopolysaccharide (www.med.sc.edu:85/fox/lps.jpg).

2.4 Protéines de la membrane externe (OMP)

Les protéines de la membrane externe ont souvent la capacité d'induire la réponse immunitaire chez le porc. App produit plusieurs protéines de membrane externe aussi appelées OMP (**O**uter **M**embrane **P**roteins). L'importance de ces protéines pour la virulence a été démontrée par Thwaites et Kadis [29]. En effet, ils ont réussi à isoler quatre protéines de la membrane externe d'App et ont démontré que ces dernières étaient immunogènes chez le porc. Ils ont aussi découvert que les anticorps produits augmentaient la phagocytose d'App par les macrophages. Parmi ces molécules, on retrouve des protéines de fixation de la transferrine, des protéines inductibles au maltose et des lipoprotéines [29].

2.4.1 Systèmes d'acquisition du fer

Le fer est essentiel pour la croissance bactérienne. De plus, il peut agir comme signal afin de réguler l'expression de plusieurs facteurs de virulence. Le fer contenu dans l'hôte est habituellement lié à des protéines ou contenu dans l'hème de l'hémoglobine [25]. C'est pour cette raison qu'App a développé différents systèmes d'acquisition du fer. Parmi ceux-ci, on note les protéines liant la transferrine, les protéines liant l'hémoglobine et les récepteurs hydroxamate ferrique [25].

Les récepteurs de transferrine, aussi appelés protéines liant la transferrine (Tbps pour transferrin-binding proteins), se retrouvent chez les *Pasteurellaceae* dont App. Ce système est composé de deux protéines répressibles par le fer : Tbp2 et Tbp1. Tbp2 est une lipoprotéine codée par le gène *tbpB*. Bog *et al.* ont démontré, à l'aide d'anticorps monoclonaux, que Tbp2 est reconnue comme antigène [9, 30]. De plus, une mutation dans le gène *tbpB* empêcherait l'acquisition du fer par App. Les mutants sont donc incapables de provoquer la maladie. Tbp1 est, quant à elle, une protéine transmembranaire qui démontre une petite variabilité de séquence entre les sérotypes. Elle est codée par le gène *tbpA*. L'efficacité de protection de Tbp1 n'a pas été évaluée suite à une infection expérimentale [30]. Les Tbps d'App ont une affinité spécifique pour les transferrines porcines uniquement [30]. Chez App, l'opéron *tbpBA* est précédé par *tonB-exbBD* et la transcription de ces cinq gènes est contrôlée par un promoteur régulé par le fer qui se situe en amont de *tonB* (voir figure 2.5) [31, 32]. Ces observations suggèrent que les gènes *tbpB* et *tbpA* feraient partie d'un plus grand opéron contenant les gènes *tonB* et *exbBD* [32].

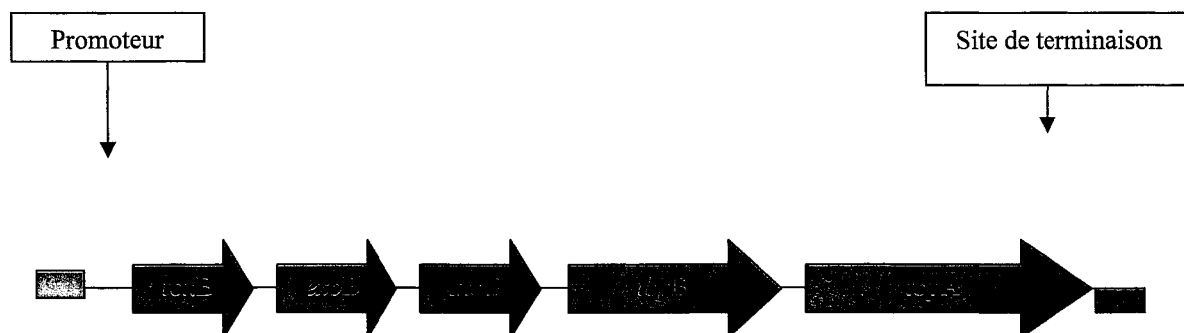


FIGURE 2.5 : Organisation des gènes *tonB*, *exbB*, *exbD*, *tbpB* et *tbpA* selon Tonpitak *et al.* [32]

Les protéines liant l'hémoglobine sont un autre moyen d'App d'utiliser le fer lors d'une infection. Deux protéines liant l'hémoglobine (75 kDa et 105 kDa) ont été isolées par Jacques *et al* [25, 33]. La protéine de 75 kDa semble capable de lier l'hémine porcine aussi bien que l'hémoglobine. De plus, elle posséderait une homologie avec d'autres protéines de la membrane externe ainsi qu'avec des transporteurs et des récepteurs *Ton*-dépendants [25, 33]. La protéine de 105 kDa, quant à elle, démontre une haute homologie avec la protéine HgbA, une protéine liant l'hémoglobine chez d'autres *Pasteurellaceae* [25]. Une mutation dans le gène *hgbA* inactive le transport de l'hémoglobine empêchant du même coup l'utilisation du fer de l'hème.

Les récepteurs d'hydroxamate ferrique (Fhu pour **f**erric **h**ydroxamate **u**ptake) permettent à App d'utiliser les ferrichromes comme source de fer. Quatre gènes ont été identifiés dans un opéron unique : *fhuC*, *fhuD*, *fhuB* et *fhuA* [34, 35]. FhuA est une protéine de la membrane externe qui sert de récepteur de ferrichromes. FhuD est une protéine périplasmique qui est responsable du transport d'hydroxamate ferrique de la membrane externe à la membrane interne. FhuB et FhuC sont des protéines associées à la membrane cytoplasmique qui servent de transporteurs ABC (ATP binding cassette) afin de faire pénétrer l'hydroxamate ferrique [34, 35]. L'énergie nécessaire au transport des ferrichromes est produite par le complexe de protéines TonB-ExbB-ExbD. Une mutation dans le gène *fhuA* abolit le système de transport des ferrichromes mais les mutants sont toujours capables d'utiliser les autres sources de fer (hémoglobine, hémine et transferrine) [25]. La virulence n'est pas atténuée par cette mutation.

2.5 Fimbriae

Les fimbriae ou pili jouent un rôle important dans la virulence d'App. Ils seraient importants pour les premiers stades de l'infection puisqu'ils permettraient l'adhésion aux cellules épithéliales du rhino-pharynx. De plus, ils augmenteraient l'interaction bactérie-bactérie. Les fimbriae de type 4 d'App sont codés par l'opéron *apfABCD* [36]. Le gène *apfA* code pour un polypeptide d'environ 16kDa qui est présent chez tous les sérotypes. Le gène *apfD* est homologue à une peptidase et les gènes *apfB* et *apfC* codent pour des protéines homologues à PilB et PilC de *P.*

aeruginosa [37]. Malgré la présence d'un promoteur intact en amont de l'opéron, la fabrication des fimbriae est hautement régulée par les conditions environnementales. C'est pour cette raison que les fimbriae sont difficiles à observer en laboratoire. En effet, un passage subséquent sur milieu de culture les fait disparaître car l'activité du promoteur n'est pas suffisante pour stimuler la formation d'un fimbriae intact sous ces conditions [38, 39].

2.6 Protéases sécrétées

Les protéases sécrétées par App contribuent à l'évolution de la pleuropneumonie puisqu'elles ont la capacité d'induire des lésions pulmonaires chez le porc en dégradant d'importantes composantes tissulaires [9]. Une protéase de haut poids moléculaire (>200 kDa) a été étudiée par Negrete-Abascal *et al.* [40] et son activité protéolytique a été observée chez tous les sérotypes. Lorsque purifiée, cette protéase a la capacité d'hydrolyser les IgA et les IgG de porc. De plus, son activité est accrue par la présence de cuivre ou de zinc [40, 41]. D'autres protéases (environ 70 kDa) sont aussi produites par App. Ces dernières ont la capacité de dégrader les IgA de porc mais pas les IgG [41].

2.7 Superoxydes dismutases

Deux superoxydes dismutases (SOD) ont été observées chez App. La première SOD Cu,Zn est régulée par le zinc et le cuivre et est codée par le gène *sodC* [42]. La seconde SOD Mn est régulée par l'oxygène et le fer et est codée par le gène *sodA* [42, 43]. Ces deux superoxydes dismutases sont exprimées durant les phases exponentielle et stationnaire lors de la croissance d'App. Par contre, seul SodC aurait un effet sur la virulence d'App. En effet, elle conférerait un avantage à la bactérie en accélérant la transformation des radicaux superoxydes produits par les neutrophiles de l'hôte. SodA serait, quant à elle, utilisée pour éliminer les radicaux libres présents dans le cytoplasme. De plus, des tests ont démontrés que les anticorps de porcs convalescents réagissaient fortement avec ces superoxydes [42]. Par contre, une étude de Sheehan *et al.* a

démontré que les mutants pour SodC étaient plus sensibles à l'action des superoxydes *in vitro* mais demeuraient pleinement virulents lors de l'infection expérimentale [42].

2.8 Uréase

L'uréase est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'urée en ammoniacque et en dioxyde de carbone. Elle est connue pour avoir un effet sur la virulence chez certains pathogènes. L'ammoniacque libérée a un effet cytotoxique sur les cellules épithéliales. Cette enzyme est codée par un opéron constitué de 8 cadres de lecture ouverts (ORF). Les gènes structuraux *ureABC* sont séparés des gènes accessoires *ureEFGD* par *ureX*, un gène de fonction inconnu [44]. L'uréase est constituée de trois sous-unités α , β , et γ de poids moléculaires différents : 61.0 kDa, 11.3 kDa et 11.0 kDa respectivement. De plus, l'enzyme se retrouve chez tous les sérotypes. L'effet de l'uréase sur la virulence a été testé par Bossé *et al.* et deux mutants ont été fabriqués [45]. À forte dose, ces mutants n'empêchaient pas l'infection mais à faible dose, ils étaient incapables de provoquer la maladie [45]. De plus, Baltes *et al.* ont démontrés qu'un mutant $\Delta ureC$ causait l'infection comme la souche parentale mais que trois semaines après l'infection, il était impossible de l'isoler du porc infecté [46].

Tableau II
Gènes codant pour des facteurs de virulence potentiels chez *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Facteurs de virulences	Gènes impliqués	Fonctions	Références
Toxines RTX	<i>apxCABD</i>	Activité cytotoxique et hémolytique Formation de pores	[2, 9, 16, 17, 18, 20]
Capsule	<i>cps5ABCD</i> <i>cpxDCBA</i>	Barrière contre la phagocytose Inhibe la voie du complément	[2, 9, 21, 22, 23, 23]
Lipopolysaccharide	<i>rfbC, rfbN, rfbU, rfbP</i>	Adhérence bactérienne Endotoxine lors de la lyse du LPS	[2, 25, 26, 27]
Protéines de la membrane externe			
Tbp2 et Tbp1	<i>tbpB</i> et <i>tbpA</i>	Protéines liant les transferrine porcines	[30, 31, 32, 33]
HgbA	<i>HgaA</i>	Protéine liant l'hémoglobine	[33]
FhuA	<i>fhuCDBA</i>	Protéines liant les ferrichromes	[34, 35]
Fimbriae	<i>apfABCD</i>	Adhérence de la bactérie aux cellules hôtes	[36, 37, 38, 39]
Protéases		Induction de lésions	[9, 40, 41]
Superoxyde dismutase	<i>sodA</i> et <i>sodC</i>	Transformation des radicaux superoxydes	[42, 43]
Uréase	<i>ureABC, ureX</i> et <i>ureEFGD</i>	Hydrolyse de l'urée en ammoniacque Inhibition du mouvement ciliaire	[44, 45, 46]

Note : Les facteurs de virulence mentionnés ci-haut ont tous été décrits en détail dans les pages précédentes.

CHAPITRE III

LA TRANSPPOSITION POUR L'IDENTIFICATION DE FACTEURS DE VIRULENCE

3.1 La transposition

La transposition est un mécanisme de recombinaison non homologue (c.-à-d. que les deux séquences d'ADN sont différentes) qui a lieu naturellement chez les bactéries et chez tous les autres êtres vivants. Elle est caractérisée par le saut d'un transposon (élément mobile fait d'un fragment d'ADN) d'un endroit à un autre sur l'ADN chromosomique ou plasmidique (voir figure 3.1) [2]. L'insertion du transposon dans l'ADN cible est aléatoire mais il arrive fréquemment que le transposon ait une préférence pour certains sites qu'on appelle « hot spots ». Il existe deux mécanismes de transposition : répllicative ou conservative. Lors de la transposition répllicative, le transposon initial demeure dans l'ADN et c'est une copie du transposon qui va s'insérer ailleurs dans l'ADN. La transposition conservative se fait, quant à elle, par l'excision du transposon initial et son insertion ailleurs. La fréquence d'une transposition varie de une fois sur 1000 à une fois sur 100 000 000 ce qui suggère que ce mécanisme est hautement régulé pour éviter les effets nocifs [47, 48].

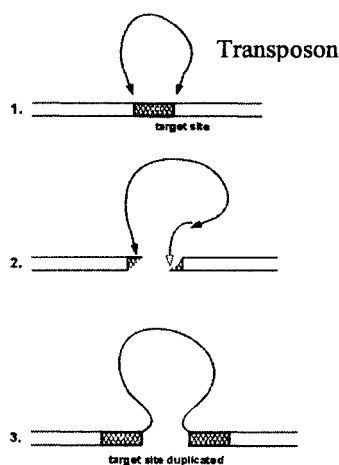


FIGURE 3.1 : Modèle de transposition.

La structure d'un transposon est relativement stable chez les procaryotes. Il existe deux principaux types de transposons : composé et non-composé. Un transposon composé (exemple : Tn5 et Tn10) possède une région centrale qui n'intervient pas dans la transposition. Le plus souvent, cette région contient des gènes de résistance à certains antibiotiques [47, 49, 50]. Ce fragment d'ADN devient mobile grâce à l'activité de la transposase codée par une des séquences d'insertion (IS pour Insertion Sequence) flanquant l'élément. Ces séquences d'insertion ont, à leurs extrémités, de courtes régions répétées qui sont en sens inverse l'une de l'autre (IR pour Inverted Repeat) et qui servent de sites de reconnaissance pour la transposase (voir figure 3.2). Un transposon non-composé (exemple : Tn3) ne possède pas de IS à chaque extrémité mais simplement les IR nécessaires à la reconnaissance de la transposase [2, 48].

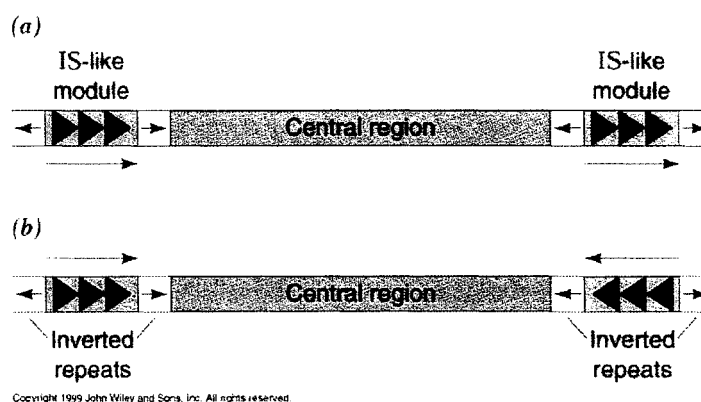


FIGURE 3.2 : Modèle de transposon composé.

(http://www.mun.ca/biochem/courses/3107/Lectures/Topics/Mobile_elements.html)

Les résultats d'une transposition à l'intérieur du génome sont habituellement caractérisés par l'apparition de mutations dans les gènes touchés. Ces mutations peuvent provoquer l'inactivation du gène touché en modifiant le cadre de lecture, en insérant un codon stop ou tout simplement en produisant une protéine inactive suite au repliement. L'inactivation de certains gènes peut modifier le phénotype et donc être observable. Lorsqu'une mutation inactive un gène nécessaire à la virulence, l'effet est facilement observable par une tentative infructueuse d'infection expérimentale [58].

Les transposons ont plusieurs limites quant à leur utilisation en laboratoire. Ils sont généralement instables et leurs tailles en fait des éléments difficiles à manipuler [51]. Pour contrer ce problème, les mini-transposons (mini-Tn) ont été développés. Ces dérivés sont modifiés de trois façons. Tout d'abord, le gène de la transposase est déplacé sur le plasmide, en amont du transposon afin d'augmenter sa stabilité éventuelle dans le chromosome. Cette modification permet d'éviter les transpositions futures et les réarrangements de l'ADN [51]. Ensuite, les séquences d'insertions sont réduites pour diminuer la fréquence de recombinaisons homologues. Finalement, des séquences de nucléotides permettant l'appariement d'amorces de séquençage sont aussi introduites à chaque extrémité. Ces mini-transposons sont construits pour contenir différents gènes de résistance aux antibiotiques. L'ajout de marqueurs de sélection permet d'obtenir facilement une banque de mutants. Par ailleurs, ces mini-transposons sont transportés à l'intérieur de vecteurs suicide qui sont incapables de se répliquer dans l'espèce bactérienne cible. Il n'y a donc qu'une seule copie du transposon à l'intérieur du génome, ce qui facilite le retraçage du transposon [51, 52].

Mini-Tn5 et mini-Tn10 sont deux transposons modifiés qui sont largement utilisés pour la mutagenèse. Les mini-transposons dérivés de Tn5 ont la capacité de transposer efficacement dans une majorité de bactéries Gram négatives. De plus, il sont généralement insérés avec une faible spécificité de séquence et la probabilité de réarrangement du génome est faible [51, 53]. Par contre, il a été démontré que les dérivés de Tn5 étaient inefficaces chez *App*. En effet, le taux de transposition avec ce transposon est en deçà de 10^{-6} . Par ailleurs, le gène de résistance à la kanamycine de Tn5 n'est pas exprimé chez *App*. [54]. Mini-Tn10, quant à lui, est un dérivé du transposon Tn10. Ces dérivés sont efficaces dans plusieurs genres bactériens incluant *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Xenorhabdus*, *Bacillus* et *Actinobacillus* [55]. Malgré le fait que mini-Tn10 soit supposé transposer de façon aléatoire, de récentes études ont démontré plusieurs sites préférentiels ou « hot spots » pour la transposition [56, 57]. Des séquences consensus ont même été identifiées par Ojha et ses collaborateurs [56]. Il a été démontré que la séquence 5'-NGCTNAGCN-3' est une séquence cible reconnue par la transposase de mini-Tn10 [56]. La présence de « hot spots » dans le génome

d'App ne permet donc pas l'inactivation de l'ensemble des gènes par mini-Tn10. Il est donc impossible d'identifier tous les gènes nécessaires à la virulence avec ces transposons.

3.2 La Signature-tag mutagenesis (STM)

Mise au point en 1995 par David Holden, la méthode de « signature-tag mutagenesis » permet d'identifier des gènes impliqués dans la virulence plus rapidement et plus facilement que par transposition [59, 60]. En effet, auparavant, les banques de mutants pouvaient être criblées seulement pour identifier les mutations qui conféraient un gain de fonction. La technologie STM fonctionne, quant à elle, par sélection négative car elle permet de mettre en évidence (d'une façon indirecte) des mutants qui ne peuvent croître *in vivo* et qui possèdent donc un gène essentiel inactivé par l'insertion d'un transposon.

À cet effet, une étiquette (tag) d'ADN unique est incorporée dans un vecteur (transposon ou plasmide). Cette étiquette possède à chaque extrémité une séquence invariable utilisée pour l'amplification [57, 60]. En faisant deux membranes de l'ADN des mutants obtenus, il est possible de comparer et détecter les mutants avirulents (voir figure 3.3). L'ADN de la banque de mutants de départ est utilisé pour faire une sonde par PCR contenant tous les tags. Cette sonde sert à hybrider la première membrane. Une deuxième sonde est produite à partir de l'ADN de mutants retrouvés après l'infection dans le modèle animal. Cette sonde sert à hybrider la deuxième membrane. Les mutants qui ne sont pas retrouvés sur la deuxième membrane ont nécessairement été mutés dans un gène essentiel ou impliqué dans la virulence.

Cette méthode a été utilisée chez plusieurs pathogènes (*S. typhimurium*, *V. cholerae*, *A. pleuropneumoniae*, etc.) et a permis de découvrir un bon nombre de gènes impliqués dans la virulence [57, 59, 60]. Chez App, deux études, qui ont été faites avec la méthode STM ont permis de découvrir plusieurs gènes classés selon leurs fonctions (enzymes de biosynthèse, facteurs de virulence, composantes de régulation cellulaire, composantes de traduction et inconnues) [57, 61].

Dans l'étude menée par Sheehan *et al.*, 105 mutants atténués contenaient le transposon mini-tn10 dans 55 gènes individuels [61]. Parmi ces insertions, trois gènes impliqués dans la biosynthèse des LPS ont été identifiés soit *rfbu*, *rfbN* et *rfbP*. De plus, deux gènes impliqués dans la biosynthèse de l'hème ont aussi été identifiés : *hemA* et *uroD*. L'insertion d'un transposon dans ces cinq gènes diminuait de 10 fois la croissance *in vitro* d'App [61]. Les autres insertions se situaient dans des gènes de virulence déjà connus comme ceux de biosynthèse de la capsule et du LPS.

Fuller *et al.* ont aussi utilisé la méthode STM chez App [57]. 800 mutants ont été criblés et 20 insertions uniques de Tn10 ont été identifiées. Parmi ceux-ci, trois gènes codant pour des facteurs de virulence potentiels ont été identifiés : *exbB* (protéine accessoire transport Ton-dépendant), *atpG* (ATP synthase) et *pnp* (polynucléotide phosphorylase) [57, 59]. Sept mutants ont été évalués pour leur potentiel de vaccin vivant atténué et ont démontré une bonne protection contre les infections homologues subséquentes [57].

L'utilisation de cette méthode demeure toutefois imparfaite puisqu'elle ne permet pas l'identification de gènes essentiels à moins que la perte de fonction ne soit que partielle [59]. En effet, si la mutation empêche la bactérie de survivre, il sera impossible de récupérer son ADN. Par ailleurs, certaines études ont démontré qu'il existe des sites préférentiels d'insertions du transposon Tn10 [57]. Entre autre, trois sites ont été identifiés chez App. Ces trois sites se retrouvent dans les gènes *rfbP*, *apvD* et *fur* mais les séquences flanquants les « hot spots » sont similaires chez les trois gènes [57].

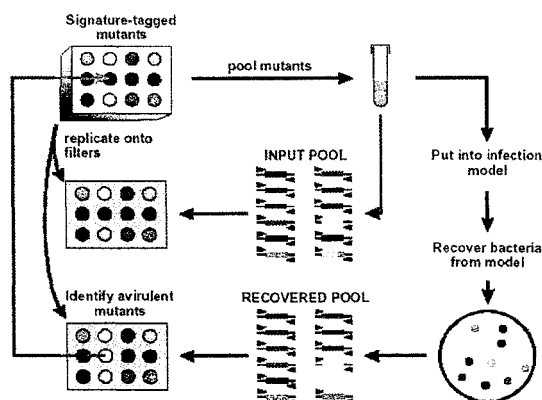


FIGURE 3.3: Modèle de la technique de mutagenèse par STM (www.v-max.co.uk/stm.htm)

3.3 Le transposome

L'utilisation du transposome a été développée afin de contrer les problèmes rencontrés lors de l'utilisation des vecteurs suicides. En effet, il existe des désavantages importants à l'utilisation de vecteurs suicides pour faire de la mutagenèse par transposition. Ces vecteurs doivent nécessairement transporter un gène pour la transposase, ce qui peut causer l'instabilité du transposon. De plus, la transposase doit être exprimée chez la bactérie cible pour que la transposition ait lieu. La nouvelle approche proposée par le transposome permet une analyse rapide des mutations provoquées par l'insertion d'un transposon. De plus, elle permet le séquençage direct de l'ADN génomique sans passer par les étapes de clonage. Par ailleurs, l'absence du gène de la transposase prévient d'éventuelle transposition [58, 62].

Lorsqu'un transposon est mis en contact avec la transposase, en absence de magnésium (Mg^{2+}), il se forme rapidement un complexe très stable appelé transposome. Lors de sa formation, la transposase va se fixer aux IR de 19 pb du transposon pour former une structure en forme d'épingle à cheveux (hairpin) (voir figure 3.4). Ce complexe stable peut facilement être électroporé à l'intérieur de cellules bactériennes. La présence de Mg^{2+} dans le cytoplasme des bactéries permet d'activer le complexe et permet la transposition. L'efficacité d'insertion varie d'une espèce bactérienne à l'autre mais est habituellement assez élevée pour produire une banque de mutants [58, 62].

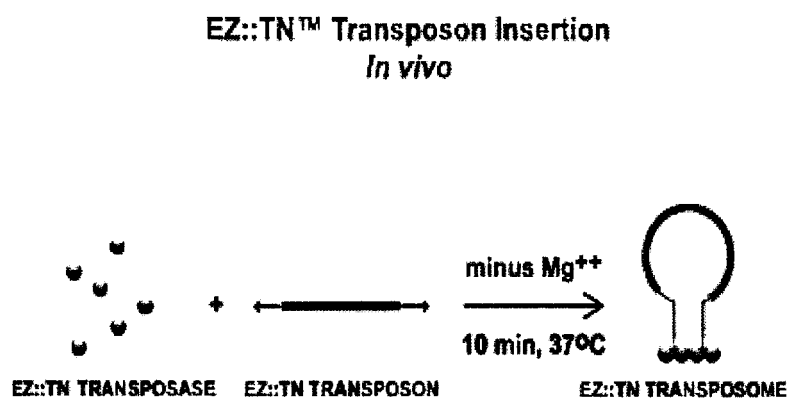


FIGURE 3.4 : Fabrication d'un complexe transposome

(http://www.cambio.co.uk/l3.php?l1_category_id=9&l2_category_id=205)

Lorsque le transposon est inséré dans l'ADN génomique, il faut pouvoir le localiser. Il existe trois méthodes pour trouver la localisation exacte de l'insertion. Soit par clonage de l'ADN muté (lorsque le transposon ne contient pas d'origine de réplication conditionnelle), soit par récupération de l'ADN muté avec l'utilisation d'une origine de réplication ou par séquençage direct de l'ADN génomique flanquant l'insertion [62].

Plusieurs transposons ne contiennent pas d'origine de réplication. Dans ce cas, l'ADN génomique doit être fragmenté par digestion enzymatique ou par sonication et introduit dans un vecteur de type fosmide, cosmide ou plasmide. Les fosmides et les cosmides sont souvent utilisés pour le clonage d'inserts de grandes tailles. De plus, les fosmides ont l'avantage additionnel d'être simple copie, ce qui prévient l'instabilité des clones contenant des gènes toxiques. Par ailleurs, il est impératif d'utiliser un gène de résistance antibiotique différent de celui du transposon pour récupérer les vecteurs [62].

Lorsque le transposon utilisé contient une origine de réplication conditionnelle, comme celle du plasmide R6K qui est conditionnelle à la protéine π de *E. coli*, l'ADN peut être clivé et lié ensuite sur lui-même. Pour récupérer le transposon possédant une origine de réplication, il suffit simplement d'électroporer l'ADN lié sur lui-même et de sélectionner les clones grâce au gène de résistance du transposon [62].

Finalement, l'ADN génomique flanquant l'insertion peut être séquencé directement sans cloner la région contenant le transposon. Pour ce faire, deux à trois microgrammes d'ADN sont nécessaires pour obtenir 400-450 nucléotides de séquence, ce qui est suffisant pour assigner une position claire du transposon dans l'ADN [62].

CHAPITRE IV

PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

4.1 Problématique de recherche

App utilise plusieurs mécanismes afin d'induire la maladie chez l'hôte. Afin de déjouer les barrières du système immunitaire de l'hôte, ce pathogène doit mettre en œuvre une série de mécanismes qui lui permettront de coloniser les poumons du porc. De plus, la bactérie doit pouvoir se protéger contre les attaques de l'hôte. Certaines composantes connues, telles que les toxines Apx, ont un rôle à jouer à ce niveau

Il est donc évident que les facteurs de virulence d'App sont nombreux et diversifiés. C'est pourquoi la prévention par les vaccins nécessite une plus grande connaissance des facteurs de virulence. Par ailleurs, les études précédentes ont démontrées les problèmes reliés à l'utilisation de mini-Tn5 (gène de résistance à la kanamycine qui ne s'exprime pas chez App) et mini-Tn10 (séquences d'insertion préférentielles et difficulté à cloner les séquences flanquant l'insertion) pour l'identification de facteurs de virulence.

Pour contrer ces problèmes, un transposome contenant un gène de résistance à la kanamycine (Kan-2) exprimable chez plusieurs bactéries a été mis au point par Épicentre Inc. Toutefois, des tests fait en laboratoire nous ont permis de constater le nombre élevé de mutants spontanés produit avec cet antibiotique. C'est donc pour cette raison, que nous avons conclu à l'utilité de fabriquer un autre transposon de type Tn5 possédant un gène de résistance autre que la kanamycine.

4.2 Hypothèses et objectifs de recherche

Les vaccins présentement utilisés dans l'industrie porcine ne permettent pas d'immuniser les porcs contre tous les sérotypes. Par ailleurs, nous savons qu'un porc convalescent, ayant été infecté naturellement, devient immunisé contre tous les sérotypes. On peut déduire qu'il existe des facteurs de virulence communs aux différents sérotypes qui nous sont encore inconnus pour la fabrication de vaccins. Le but

du projet de recherche est de **fabriquer un transposon de type Tn5 fonctionnel chez App**. Ce transposon permettra éventuellement d'identifier de nouveaux facteurs de virulence par mutagenèse aléatoire et de vérifier l'homologie chez les différents sérotypes. À plus long terme, ces recherches permettront d'élucider les mécanismes de virulence utilisés par App.

CHAPITRE V MATÉRIEL ET MÉTHODES

5.1 Souches utilisées et conditions de croissance

Une souche résistante à l'acide nalidixique (Nal^R) d'App sérotype 1 (4074) ainsi qu'une souche sauvage d'App sérotype 1 (4074) ont été utilisées lors de cette étude. Les souches ont été cultivées et repiquées à 37°C sur gélose TSA complémentée de sang et de β -NAD (100 μ g/ml) ou dans un bouillon TSB contenant 1% d'IsoVitaleX. La souche d'*E. coli* DH5 α a été cultivée sur milieu Luri-Bertani (LB) avec les antibiotiques appropriés à une température de 37°C. Pour *E. coli* et App, les antibiotiques suivants ont été utilisés aux concentrations finales indiquées : ampicilline 100 μ g/ml, kanamycine 50 μ g/ml, chloramphénicol 10 et 15 μ g/ml et tétracycline 4 et 10 μ g/ml.

5.2 Identification des gènes de résistances efficaces

Des tests ont été effectués afin de déterminer quels antibiotiques seraient efficaces dans la construction de notre transposon. Les antibiotiques suivants ont été testés aux concentrations indiquées : streptomycine 50 μ g/ml, tétracycline 10 μ g/ml, kanamycine 40 et 50 μ g/ml, chloramphénicol 15 μ g/ml et ampicilline 20 et 50 μ g/ml. Pour vérifier le taux de mutants spontanés obtenu avec chaque antibiotique, nous avons effectué une électro-transformation d'App sans vecteur. Cette transformation a ensuite été étalée sur géloses TSA NAD (100 μ g/ml) sang contenant les antibiotiques mentionnés précédemment. Les résultats ont permis de conclure que la tétracycline et le chloramphénicol semblaient plus propices à la poursuite du projet.

5.3 Isolation de l'ADN

L'ADN chromosomique d'App a été isolé à l'aide du AquaPure DNA Genomic kit de Bio-Rad en suivant les instructions du fabricant. Il a aussi été isolé par ébullition. Cette méthode consiste à faire bouillir les cellules bactériennes pendant 10 minutes. L'ADN est ensuite récupéré par aspiration du surnageant obtenu lors d'une centrifugation de 2 minutes à 13 000 rpm. L'ADN plasmidique d'App et d'*E. coli* a été

isolé à l'aide du QIAprep spin, mini-prep kit (Quiagen) avec les indications de la compagnie.

5.4 Préparation des vecteurs

Les vecteurs utilisés dans ce projet ont été digérés par différentes enzymes afin de faciliter le clonage du gène de résistance à l'antibiotique. Les vecteurs suivants ont été utilisés dans cette étude : pDrive Cloning Vector (Qiagen), TOPO-TA (Invitrogen), PCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen), EZ::TNTM pMOD-2TM <MCS> (Epicentre) et EZ::TNTM pMOD-3TM R6K γ ori (Epicentre). Pour les vecteurs de type TOPO, aucune digestion n'est nécessaire puisque ces vecteurs sont déjà sous forme linéaire. Les vecteurs de type pMOD ont, quant à eux, été digérés avec les enzymes de restrictions suivantes : PstI (Roche), BamHI (NEB), EcoRI (NEB) et HincII (NEB). Les digestions ont été effectuées selon les conditions mentionnées par le fabricant et inactivées en ajoutant 2 μ l d'une solution contenant 50% de glycérol, 50 mM d'EDTA (pH 8.0) et 0.05% de bleu de bromophénol ou par augmentation de la température à 65°C pendant 20 minutes. Une déphosphorylation a été nécessaire afin d'éviter la recircularisation des fragments. La déphosphorylation s'est faite à 37°C pendant 60 minutes avec de l'alcaline phosphatase de crevettes (Roche) et l'inactivation s'est faite à 65°C pendant 15 minutes.

5.5 Amplification des gènes de résistance

L'amplification des gènes de résistance au chloramphénicol plasmidique (chl^{rP}), à la tétracycline plasmidique (tet^P) et à la tétracycline chromosomique (tet^C) s'est faite à l'aide d'amorces conçues dans notre laboratoire et synthétisées par la compagnie Invitrogen. Un Thermal cycler de type PTC-100 Programmable Thermal Controller de MJ Research inc. a été utilisé pour toutes les amplifications.

Pour le gène chl^{rP}, l'ADN matrice du plasmide sauvage d'App (pMS3) contenant le gène de résistance au chloramphénicol et les amorces cl-1 (5'-ggC gCT gAA AgA AAC CgC AA-3') et cl-3 (5'-TCT gAT gAA CAg ggC TTC AC-3') ont été utilisées

pour obtenir un amplicon de 789 pb. L'amplification a été faite avec la Platinum Pfx polymérase (Invitrogen) et la DNA Taq Polymerase (NEB) dans les conditions suivantes : une dénaturation et une activation enzymatique de 2 min. à 94°C suivie de 30 cycles à 94°C pour 15 sec., 58°C pour 30 sec. et 72°C pour 1 minute.

Pour le gène *tet^P*, le plasmide sauvage d'App (pAF) a été utilisé comme ADN matrice avec les amorces pTET-F (5'-CTA AAg Agg Cgg Agg ATC TA-3') et pTET-R (5'-CTA AgC ACT TgT CTC CTg TT-3') afin d'obtenir un amplicon de 1270 pb. L'amplification a été faite avec la Platinum Pfx polymérase (Invitrogen) et avec la DNA Taq Polymérase (NEB) dans les conditions suivantes : une dénaturation et une activation enzymatique de 2 min. à 94°C suivie de 30 cycles à 94°C pour 1 min., 50°C pour 1 min. et 72°C pour 2 minutes.

Pour le gène *tet^C*, l'ADN chromosomique d'une souche d'App 4074 résistante à la tétracycline a été utilisé comme matrice avec les amorces ctet-pro F (5'-ggg gAA ATC CTg CCg CTT TT-3') et B1-A (5'-gCT gTT AAg CTA ACT TgT gg-3') pour obtenir un amplicon de 2272 pb. La Platinum Pfx Polymérase (Invitrogen) et la DNA Taq Polymérase (NEB) ont été utilisées pour l'amplification avec les conditions d'amplification suivantes : une dénaturation et une amplification enzymatique de 2 min. à 94°C suivie de 30 cycles à 94°C pour 1 min., 50°C pour 1 min. et 72°C pour 2 minutes.

Les produits PCR obtenus ont été déposés sur un gel d'agarose 0.8% pendant 90 minutes à 80V afin de vérifier la taille des amplicons. Les fragments ont ensuite été extraits du gel d'agarose avec le QIAquick gel extraction kit de Qiagen en suivant le protocole fourni par la compagnie.

5.6 Clonage des gènes de résistance

Les gènes de résistance ont été clonés dans les vecteurs de type pMOD, TOPO et pDrive. Les vecteurs pDrive et TOPO nous permettent de vérifier rapidement l'expression du gène cloné. Les vecteurs de type pMOD ont, quant à eux, la caractéristique principale de posséder un site de clonage multiple (MCS) à l'intérieur de

la séquence d'un transposon de type Tn5 (voir figure 5.1). Pour cloner les gènes à l'intérieur des vecteurs, nous avons utilisé la T4 DNA ligase (NEB) à une température de 16°C pour une période de 12 à 16 heures. Les ligations ont ensuite été dessalées pendant 1hre 30 sur la glace dans des colonnes de dessalage contenant de l'agarose 1%-glucose 100µM. Les vecteurs sont ensuite prêts à être transformés par électroporation pour pMOD et pDrive et par choc thermique pour TOPO. La transformation par choc thermique se fait en incubant le vecteur et le gène de résistance 5 minutes à température pièce.

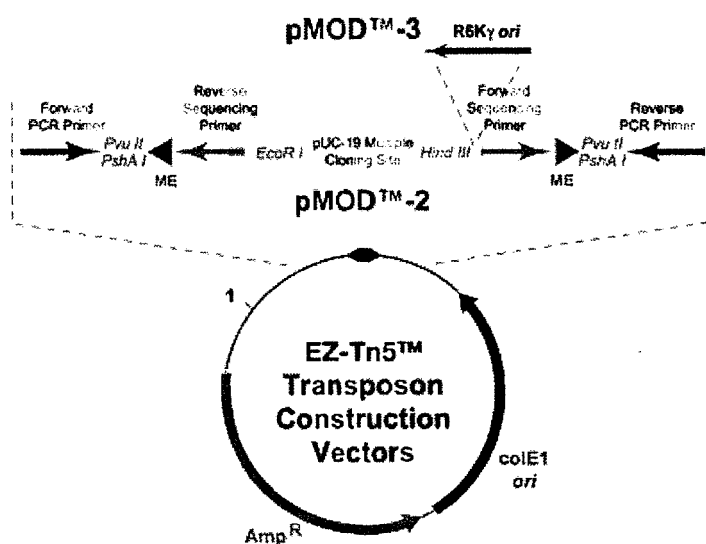


FIGURE 5.1 : Figure du vecteur pMOD-2 <MCS> et pMOD-3 R6Kγori utilisé pour la fabrication des transposon TnCl^p, TnTet^p et TnTet^c. Les gènes de résistances ont été clonés dans la partie MCS (multiple cloning site) du vecteur.

L'électroporation s'est faite en utilisant 40µl de cellules compétentes d'*E. coli* DH5α et 1µl de vecteur dans des cuvettes à électroporation de 1 mm avec un voltage de 1.8 kV. Après l'électroporation, 1 ml de milieu de culture TSB est ajouté aux cellules et elles sont incubées pendant 1hre 30 à 37°C. Par la suite, 2µl de ligation sont ajoutés aux cellules compétentes One shot cells et le tout est déposé 5 à 30 minutes sur glace. Pour produire un choc thermique, les cellules sont transférées à 42°C pour 30 secondes. L'ajout de 250µl de milieu SOC ainsi que l'incubation à 37°C avec agitation permet la croissance des clones. Les cellules transformées sont par la suite étalées sur un milieu de culture contenant l'antibiotique sélectionné (i.e. le même que le gène cloné) et

réincubées à 37°C pour une période de 12 à 16 heures. Les clones possédant une résistance sont isolés afin de vérifier la taille de leur plasmide par criblage.

Le criblage des clones recombinants permet de vérifier rapidement par la taille si le clonage du gène de résistance à l'intérieur des plasmides a fonctionné. Il s'agit simplement de prélever une petite quantité de cellules avec un cure-dent stérile et de les déposer dans 25 µl d'eau stérile et 25 µl de tampon de cracking. Vingt cinq microlitres de cette solution sont déposés sur un gel d'agarose 1% pour une migration de 120 minutes à 80 V. Les tailles des plasmides sont ensuite vérifiées avec un marqueur supercoiled d'Invitrogen.

5.7 Préparation des transposons

Le transposon a été préparé par amplification ou par digestion enzymatique. Pour l'isolation par amplification, les amorces pMOD™<MCS> Forward PCR Primer (5'-ATT CAg gCT gCg CAA CTg T-3') et pMOD™<MCS> Reverse PCR Primer (5'-gTC AgT gAg CgA ggA AgC ggA Ag-3') sont fournies par la compagnie Epicentre. Pour TnCl^P, la réaction de polymérisation en chaîne s'est faite à l'aide de la Pfx Platinum DNA polymérase (Invitrogen) avec les conditions d'amplification suivantes : une dénaturation de 2 minutes à 94°C, suivi de 30 cycles de 30 sec. à 94°C, de 45 sec. à 60°C et de 1 minute à 72°C. Pour TnTet^P, les conditions d'amplification étaient les suivantes : une dénaturation et une activation de 2 min. à 94°C suivie de 30 cycles de 94°C pour 30 sec., de 60°C pour 45 sec. et de 72°C pour 2 minutes. Les conditions d'amplification pour TnTet^C étaient de 94°C pour 2 min. suivies de 30 cycles de 94°C pour 15 sec., de 60°C pour 30 sec. et de 68°C pour 3 minutes.

Pour isoler le transposon par digestion enzymatique, deux enzymes peuvent être utilisées, soit PvuII et PshAI. Ces enzymes possèdent un site de restriction à chaque extrémité du transposon. Par contre, lors de notre étude, nous avons constaté que PvuII (NEB) ne donnait pas le bon patron de digestion contrairement à PshAI (NEB). C'est pour cette raison que les digestions ont toutes été faites avec PshAI à 37°C pendant 2

heures puis inactivées avec 2 μ l d'une solution contenant 50% de glycérol, 50 mM d'EDTA (pH 8.0) et 0.05% de bleu de bromophénol.

Les amplicons obtenus ainsi que les digestions ont été déposés sur gel d'agarose 1% pour une migration de 1hre30 à 80V afin de vérifier et d'isoler le transposon. L'ADN a été extrait du gel avec le QIAquick gel extraction kit de Qiagen en suivant les instructions fournies par le fabricant.

5.8 Préparation des transposomes

Le complexe transposome est fabriqué par contact entre de la transposase hyperactive (Epicentre) et le transposon dans une solution de glycérol, en absence de magnésium (Mg^{2+}). La réaction se fait à la température de la pièce pendant 30 minutes. Le transposome peut ensuite être transformé à l'intérieur de cellules compétentes. Les cellules ont été préparées par une incubation à 37  C pendant 12 à 16 heures dans 4 ml de TSB IsoVitaleX 1%. L'incubation est poursuivie pendant 90 minutes après l'ajout de 36 ml de TSB IsoVitaleX 1%. Les cellules sont ensuite transférées dans un tube à centrifugeuse pour éliminer le bouillon d'enrichissement par deux lavages subséquents à l'eau stérile froide à 3000 rpm pendant 20 minutes. Le culot obtenu est ensuite resuspendu dans le volume résiduel. Le protocole d'électroporation est le même que lors de la préparation du transposon.

5.9 Tests de transposition *in vitro*

Afin de vérifier l'efficacité de la transposase et l'insertion du transposon, des tests de transposition *in vitro* ont été effectués. Cette technique consiste à mettre en contact un vecteur (ici pUC18) avec le transposon construit et de la transposase afin de vérifier si le transposon s'insère dans le vecteur. Les tests ont été effectués avec les transposons TnCl^p, TnTet^p et TnTet^C. Une expérience contrôle a été effectuée avec le transposon commercial d'Epicentre EZ ::TnKan-2. La réaction de transposition *in vitro* est induite par l'ajout de la transposase, du transposon et du vecteur dans un tampon de réaction 10X. Le mélange est incubé 2 heures à 37  C. La réaction a ensuite été arrêtée

par l'ajout d'un microlitre de solution d'arrêt 10X et par incubation à 70°C pendant 10 minutes.

Les réactions d'insertions ont ensuite été électroporées dans des cellules compétentes de *E. coli* DH5α et ont été étalées sur milieux LB Chlr 10 µg/ml, LB Tet 6 et 10 µg/ml, LB Kan 50 µg/ml et AXI (ampicilline, X-Gal et IPTG). Les clones récupérés ont été criblés et vérifiés sur gel d'agarose 1% afin de vérifier la taille des vecteurs. La taille recherchée devrait correspondre à celle du vecteur additionnée à celle du transposon soit 3795pb pour TnCl^p et pUC18, 3886pb pour TnTet^p et pUC18, 5472pb pour TnTet^c et pUC18 et 4386pb pour TnKan-2 et pUC18.

5.10 Construction d'une banque de mutants

La construction de la banque de mutants est présentement en cours. Cette banque est construite en électroporant le transposome TnTet^CNew à l'intérieur de cellules compétentes d'App 4074 et 4074 Nal^R. Les protocoles pour la préparation des cellules électrocompétentes et pour l'électroporation ont déjà été mentionnés dans la section préparation du transposome. Les clones résistants sont ensuite récupérés pour d'éventuelles analyses génétiques.

5.11 Analyses génétiques et bio-informatique

Les différentes analyses génétiques ont été faites grâce aux logiciels CloneManager 7 ainsi qu'aux différents sites Internet consultés pour obtenir des séquences de gènes, des cartes de restriction, des comparaisons de séquences. Les sites suivants ont tous été consultés : Nash Lab (<http://endeavour.bio.nrc.ca/index.php>) NCBI (National Center for Biotechnology Information) (www.ncbi.nlm.nih.gov/), Readseq-biosequence conversion tool (<http://cbribss.bio.nrc.ca/cgi-bin/readseq.cgi>), ExPASy (Expert Protein Analysis System) (<http://ca.expasy.org/>), Deambulum (<http://www.infobiogen.fr/deambulum/index.php>) et Emboss (European Molecular Biology Open Software Suite) (<http://cbrmain.cbr.nrc.ca/EMBOSS/index.html>).

CHAPITRE VI

RÉSULTATS ET DISCUSSION

6.1 Transposon TnCl^P

Le transposon contenant le gène de résistance au chloramphénicol plasmidique n'a pas permis d'obtenir de clones dans App et dans *E. coli*. Nous avons testé plusieurs transposons contenant ce gène mais aucun n'était efficace. Les incubations ont été prolongées à 48 heures afin d'augmenter le taux de croissance bactérienne mais seul des colonies de mutants spontanés ont été retrouvées sur les milieux contenant l'antibiotique.

Par contre, nous savons que le gène de résistance au chloramphénicol peut être exprimé chez App ainsi que chez *E. coli*. En effet, nous avons constaté que lorsqu'il est inséré à l'intérieur d'un plasmide, les clones ayant incorporé le vecteur deviennent résistants au chloramphénicol. Avec les vecteurs pCR-II TOPO-TA/chlr et pCR-II TOPO-Blunt/chlr, nous avons obtenu des tapis bactériens (>300 colonies) sur géloses LB Chlr 15µg/ml amp 100µg/ml. Les vecteurs pMOD-2 <MCS>/chlr et pMOD-3 R6K_{ori}/chlr ont aussi permis l'obtention de tapis bactériens sur LB Chlr 15µg/ml amp 100µg/ml lors de leur réélectroporation. De plus, les tests de transposition *in vitro* du transposon dans pUC18 ont démontrés la capacité de TnCl^P à s'insérer dans l'ADN plasmidique et à exprimer la résistance chez *E. coli* DH5α.

Par ailleurs, le vecteur pMOD-2 <MCS> contenant le gène *chlr* a été envoyé au séquençage au laboratoire d'analyse d'acides nucléiques du RSVS de l'Université Laval à Québec, afin de vérifier l'intégrité de la séquence du transposon. Les résultats obtenus démontraient que le gène ne possédait pas de mutations ou de délétions qui auraient pu empêcher son expression dans les cellules bactériennes (Figure 6.1). Les résultats obtenus démontrent que la construction TnCl^P est efficace lorsqu'elle est à l'intérieur d'un plasmide puisque nous avons obtenus une moyenne d'environ 285 clones résistants au chloramphénicol par gélose LB Chlr 10µg/ml.

Il est donc fort probable que le fait que le gène se retrouve en simple copie à l'intérieur du génome d'App ou de *E. coli* implique un faible taux d'expression, ne permettant pas aux clones de croître en présence d'une concentration minimale de l'antibiotique.

```

ME
1  GCGAT*CGGTGCG*GGCCTCTTCGCTATTA*CGACA GCTGTCTCTT ATACACATCTCAACCATCAT
60
61  CGATGAATTT TCTCGGGTGT TCTCGCATAT TGGCTCGAAT TCGAGCTCGG TACCCGGGGA 120
      HincII      Amorce Cl-I
121 TCCTCTAGA GAATTCGT TAACTGCACA TTCGGGATAT 180
181 TTCTCTATAT TCGCGCTTCA TCAGAAAAAA AATTCAGAAG GGATATGTT AACTATAC 240
241 AAAATTTGAT GTAAAAAATT GGGTTCGCCG TGAGCATTTT GAGTTTATC GGCATCGTTT 300
301 ACCATGTGGT TTTAGCTTAA CAAGCAAAAT TGATATCACG ACGTTAAAAA AGTCATTGGA 360
361 TGATTTCAGCG TATAAGTTTT ATCCGGTAAT GATCTATCTG ATTGCTCAGG CCGTGAATCA 420
421 ATTTGATGAG TTGAGAATGG CGATAAAAGA TGATGAATTG ATCGTATGGG ATTCAGTCGA 480
481 CCCACAATTC ACCGTATTCC ATCAAGAAAC AGAGACATTT TCAGCACTGA GTTGCCCAT 540
541 CTCATCCGAT ATTGATCAAT TTATGGTGAA TTATTTATCG GTAATGGAAC GTTATAAAAG 600
601 TGATACCAAG TTATTTCTC AAGGGGTAAC ACCAGAAAAT CATTTAAATA TTTCAGCATT 660
661 ACCTTGGGTT AATTTTGATA GCTTTAATTT AAATGTTGCT AATTTTACCG ATTATTTTGC 720
721 ACCCATTATA c(A)CAATGGCAAAATATCAGCAAGAAGGGGAT AGACTGTTAT TGCCGCTCTC 780
781 AGTACAGGTT CATCATGCAG TTTGTGATGG CTTCCATGTT GCACGCTTTA TTAGTCGGCT 840
841 ACAAGAGTTG TGTAACAGTA AATTAAAATA AGCTCAGGTT AAATTAAAGG GTTTCATATC 900
      Amorce Cl-III      HincII
901 TA CTGCAG GCATGCAAGC TTGCCAACGA CTACGCACTA 960
ME
961 GCCAACAAGA GCTTCAGGGT TGAGATCTCT ATACACATCA GCTGTCTG(T)TAATGAATCGGCC1020
1021 AACGCGCGGG GAGAGGCGGT TTGCGTATTGG GCC(G)C

```

FIGURE 6.1: Séquence du transposon à l'intérieur de pMOD-2<MCS>/chl_r. Séquencé avec les amorces FP-1 et RP-1. Note : Les lettres soulignées sont manquantes et celles entre parenthèses représentent la lettre qui aurait dû être à la place de la précédente. Les erreurs que l'on retrouve sur le brin codant ne se retrouvent pas dans le séquençage du brin complémentaire.

6.2 Transposon TnTet^P

Le transposon contenant le gène de résistance à la tétracycline plasmidique a posé le même problème que celui contenant le gène de résistance au chloramphénicol. Aucun clone n'a pu être obtenu suite à l'électroporation du transposome à l'intérieur de *E. coli* et d'App. Nous avons toutefois pu constater que le gène de résistance à la tétracycline plasmidique est, lui aussi, exprimé chez *E. coli* et App lorsqu'il se retrouve à l'intérieur d'un vecteur. En effet, les électroporations du vecteur pCR-II TOPO-TA/tet^P permettaient d'obtenir des tapis bactériens sur géloses LB Chl_r 15µg/ml amp 100µg/ml.

Par contre, à l'intérieur des vecteurs pMOD-2 <MCS> et pMOD-3 R6K γ ori, le nombre de clones résistants est demeuré bas.

Par ailleurs, les tests de transposition *in vitro* effectués avec notre transposon TnTet^P ainsi qu'avec un transposon commercial d'Epicerentre Tn-Kan-2 (contrôle positif) ont permis d'obtenir des tapis bactériens sur géloses LB tet 10 μ g/ml et LB kan 50 μ g/ml. Ces résultats nous permettent de conclure que le gène de résistance à la tétracycline plasmidique est exprimé et que la transposition s'effectue correctement à l'intérieur d'un ADN cible (ici pUC18).

Le problème réside probablement dans le fait que sous la forme de transposon, le gène se retrouve en simple copie à l'intérieur du génome. Comme pour le gène de résistance au chloramphénicol, le taux d'expression du gène de résistance à la tétracycline plasmidique est probablement trop faible pour permettre la survie des clones sur un milieu contenant l'antibiotique.

6.3 Transposon TnTet^C

Le transposon contenant le gène de résistance à la tétracycline chromosomique semble avoir un taux d'expression plus élevé. En effet, les transposons TnTet^C nous ont permis d'obtenir des clones résistants à la tétracycline. Le gène Tet^C a été cloné dans le vecteur pMOD-3 R6K γ ori afin de faciliter les analyses ultérieures des mutants.

Des tests d'insertion *in vitro* ont tout d'abord été effectués. Pour le transposon TnTet^CNew nous avons obtenu environ 250 colonies sur gélose LB tet 6 μ g/ml et LB tet 10 μ g/ml. Les clones retenus lors de cette électroporation ont été criblés afin de vérifier l'insertion du transposon dans le vecteur pUC18. Les résultats démontraient qu'il y avait bien eu un événement de transposition.

La transformation du transposome TnTet^CNew à l'intérieur de cellules bactériennes a permis d'obtenir environ 300 colonies dans *E. coli* DH5 α et une trentaine de colonies dans App. Afin de vérifier que la résistance acquise n'était pas spontanée,

des tests par PCR ont été effectués sur l'ADN génomique des clones. Les amorces utilisées pour amplifier le transposon ont été utilisées avec l'ADN génomique des clones obtenus afin de vérifier l'insertion du transposon dans le génome. Les résultats ont démontrés une amplification de la taille du transposon pour chaque clone testé (voir figure 6.3).



FIGURE 6.2 : Photo d'un test PCR effectué avec les amorces Fw-1 et Rv-1 d'Invitrogen sur l'ADN génomique de clones obtenus après la transposition. Dans le puit 1 il y a le marqueur 1Kb DNA ladder. Le puit 2 ne contient rien. Dans le puit 3, il y a le contrôle négatif fait sur l'ADN génomique d'App (aucune amplification ne devrait être observée puisque l'ADN génomique d'App ne contient pas le gène tet). Les puits 4 à 11 contiennent les PCR faits avec l'ADN génomique des clones 1 à 8 d'App. Le puit 12 contient le PCR fait sans ADN génomique (contrôle négatif) et le puit 13 contient le contrôle positif fait avec l'ADN du vecteur pMOD-3 R6K yori/tet^C.

Les résultats obtenus avec ce transposon démontrent qu'un gène chromosomique semble plus efficace pour la fabrication d'un transposon puisqu'il semble posséder un taux d'expression plus élevé qu'un gène plasmidique. De plus, le vecteur pMOD-2 <MCS>/tet^C ayant servi à la fabrication du transposon a été envoyé à la compagnie Epicentre. Cette collaboration nous permettra d'obtenir une quantité suffisante de transposome afin de construire notre banque de mutants.

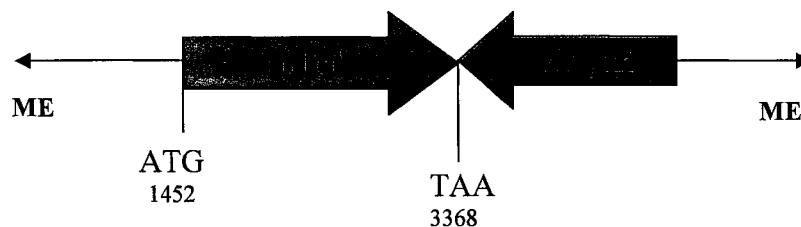


Figure 6.3 : Schéma du transposon TnTet^CNew.

6.4 Banque de clones

Une banque de clones est présentement en construction afin de faire d'éventuelles analyses génétiques des gènes mutés avec le transposon TnTet^CNew. Il est donc nécessaire de continuer les transformations du complexe transposome à l'intérieur des cellules bactériennes afin d'obtenir suffisamment de clones pour cribler tout le génome d'App. Par ailleurs, les recherches effectuées en parallèle par la compagnie Epicentre permettront sûrement l'obtention de résultats importants pour la recherche de facteurs de virulence potentiels.

CHAPITRE VII

CONCLUSION GÉNÉRALE

La pleuropneumonie porcine est actuellement un problème d'envergure pour les producteurs de porcs. D'importants travaux sont mis en œuvre afin de mieux comprendre la pathogenèse d'App. Les informations au sujet de cette bactérie n'ont cessé de croître depuis quelques années. Malgré tout, la maladie demeure présente à travers le monde.

Notre étude a été conduite dans le but de développer un nouvel outil afin de mettre en évidence de nouveaux facteurs de virulence. Les résultats obtenus permettront éventuellement d'élucider le fonctionnement de la virulence chez App.

7.1 Le transposome en relation avec les facteurs de virulence

L'utilisation du transposome est une méthode qui permet la mutagenèse rapide et aléatoire du génome d'App. Les gènes ainsi mutés sont facilement analysés afin de vérifier l'effet obtenu sur la virulence. Toutefois, cette technique possède certaines limitations :

1. Le marqueur de sélection (gène de résistance) utilisé doit avoir un taux d'expression assez élevé lorsqu'il est en simple copie
2. Le transposome ne doit pas contenir le site de restriction utilisé pour la digestion de l'ADN servant au clonage éventuel des régions flanquantes
3. Le taux de transposition demeure faible chez App (10 fois moins de clones que dans *E. coli*)

Les transposons fabriqués avec des gènes de résistance plasmidiques ont démontré leurs inefficacités pour la mutagenèse. Le fait que ces gènes se retrouvent habituellement en copies multiples en est probablement la cause. En effet, comme mentionné précédemment, il est fort probable qu'en copie unique, le niveau d'expression

des gènes plasmidiques soit trop faible pour permettre la résistance du mutant sur une gélose contenant une concentration minimale d'antibiotique.

Par ailleurs, le transposon fabriqué avec le gène de résistance à la tétracycline chromosomique semble avoir un meilleur potentiel pour la mutagenèse. Les résultats obtenus jusqu'à maintenant démontrent une meilleure efficacité du complexe transposome puisque le nombre de mutants retrouvé est supérieur. La banque de clones qui sera obtenue permettra de faire une analyse des facteurs de virulence potentiels par séquençage et aussi par une étude de virulence.

7.2 Le transposon Chl^{rP}

Malgré le fait que ce transposon n'ait pas permis d'obtenir des clones, il n'en demeure pas moins que le gène de résistance au chloramphénicol plasmidique pourrait être utile pour d'autres études. Nous avons démontré que le chloramphénicol entraîne un faible taux de mutants spontanés chez App et que le gène *catIII* peut être exprimé chez cette bactérie ainsi que chez *E. coli*. Toutefois, d'autres études devraient être effectuées afin d'augmenter le taux d'expression du gène.

7.3 Le transposon Tet^P

Bien que le gène de résistance à la tétracycline plasmidique n'ait pas permis la fabrication d'un transposon efficace, nous avons pu constater son expression chez *E. coli* ainsi que chez App (à l'intérieur du vecteur pMOD-2TM <MCS>). Toutefois, les résultats obtenus avec ce transposon démontraient l'inefficacité des gènes de résistance plasmidiques à induire une résistance lorsqu'ils sont en simple copie dans la cellule.

Par contre, les tests effectués pour déterminer les antibiotiques les plus efficaces ont démontrés que la tétracycline entraînait un faible taux de mutants spontanés. Le gène de résistance à la tétracycline plasmidique pourrait donc avoir d'éventuelles utilités dans la fabrication d'un vecteur de clonage ou d'expression. Pour son utilisation à

l'intérieur d'un transposon, il faudra continuer les recherches afin de trouver un moyen d'augmenter le taux d'expression.

7.4 Le transposon Tet^c

Grâce à l'insertion du gène de résistance à la tétracycline chromosomique d'App à l'intérieur du vecteur pMOD R6K γ ori, nous avons réussi à fabriquer un transposon de type Tn5 efficace chez App (TnTet^cNew). Ce transposon nous a permis d'obtenir de bons résultats, en comparaison avec les autres transposons. En effet, nous avons réussi à obtenir des clones contenant le transposon à l'intérieur de l'ADN génomique d'App. De plus, nous avons pu constater que le gène de résistance à la tétracycline chromosomique d'App pouvait être exprimé chez d'autres espèces bactériennes comme *Escherichia coli*.

Par ailleurs, la tétracycline est un antibiotique de choix puisque le taux de mutants de résistance spontanée est faible. De plus, il a été démontré que les transposons de type Tn5 n'ont pas le désavantage d'avoir des sites d'insertions préférentielles comme les transposons de type Tn10. Il est donc évident que la mutagenèse aléatoire sera grandement facilitée avec la fabrication de ce transposon.

7.5 Perspectives d'avenir

Le but du projet de recherche étant la fabrication d'un transposon efficace chez App, la recherche de nouveaux facteurs de virulence pourra débiter avec la construction d'une banque de clones. Grâce à l'origine de répllication γ ori que possède le transposon que nous avons fabriqué, nous pourrions découvrir des facteurs de virulence potentiels beaucoup plus rapidement qu'avec les méthodes précédentes. L'identification de ces nouveaux facteurs de virulence chez App permettra d'augmenter notre niveau de compréhension des mécanismes utilisés par ce pathogène lors de l'infection. Éventuellement, l'élucidation de la virulence d'App permettra la conception de nouveaux traitements préventifs. Par ailleurs, il est permis de croire que cette nouvelle technologie pourra être utile pour la recherche de facteurs de virulence chez plusieurs autres espèces bactériennes pathogènes.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Van Nieuwenhuyge, P.** 2002. Rapport sur la dynamique du développement économique de l'industrie; Le cas de la filière porcine. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec.
2. **Euzéby, J. P.** 1998. Dictionnaire de bactériologie: *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Société de bactériologie systématique et vétérinaire: Toulouse.
3. **Pattison, I. H., D. G. Howell, and J. Elliot.** 1957. A *haemophilus*-like organism isolated from pig lung and the associated pneumonic lesions. J. Comp. Pathol. **67**: 320-330.
4. **Taylor, D. J.** 1999. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Bacterial diseases. p. 343-354.
5. **Fodor, L., J. Varga, E. Molnar, and I. Hajtos.** 1989. Biochemical and serological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 strains isolated from swine. Vet. Microbiol. **20**: 173-180.
6. **Bertschinger, H. D., and P. Seifert.** 1978. Isolation of a *Pasteurella haemolytica*-like organism from porcine necrotic pleuropneumonia. 5th I.P.V.S. World Congress on Hyology and Hyiatrics. Zagreb. M19.
7. **Wilkins, W.** 1964. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.1. London. page 572.
8. **Van Overbeke I., K. Chiers, R. Ducatelle, and F. Haesebrouck.** 2001. Effect of endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 of pigs vaccinated with a vaccine containing Apx toxins and transferrin-binding proteins. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health. **48**: 15-20.
9. **Tascon, R.I., J. A. Vazquez-Boland, C. B. Gutierrez-Martin, J. I. Rodriguez-Barbosa, and E. F. Rodriguez-Ferri.** 1996. Virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Microbiologia. **12**: 171-184.
10. **Haesebrouck, F.** 1996. Les infections par l'*Actinobacillus pleuropneumoniae* chez le porc: derniers développements. p. 33-49. Association française de médecine vétérinaire porcine.
11. **Fenwick, B., and S. Henry.** 1994. Porcine pleuropneumonia. J. Am. Vet. Med. Assoc. **204**: 1334-1340.
12. **Bossé, J. T., H. Janson, B. J. Sheehan, A. J. Beddek , A. N. Rycroft, J. S. Kroll, and P. R. Langford.** 2002. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. Microbes Infect. **4**: 225-235.
13. **Blackall, P.J., H. L. Klaasen, H. van den Bosch, P. Kuhnert, and J. Frey.** 2002. Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. Vet. Microbiol. **84**: 47-52.
14. **Gottschalk, M.** 1999. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: an uptade. p. 357-363. American Association of Swine Practitioners.
15. **Gutierrez, C.B., S. Piriz, S. Vadillo, and E. F. Rodriguez-Ferri.** 1993. In vitro susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains to 42 antimicrobial agents. Am. J. Vet. Res. **54**: 546-550.
16. **Cho, W. S., and C. Chae.** 2001. Expression of the apxIV gene in pigs naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J. Comp. Pathol. **125**: 34-40.

17. **Jansen, R., J. Briaire, A. B. van Geel, E. M. Kamp, A. L. Gielkens, and M. A. Smits.** 1994. Genetic map of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxin (Apx) operons: characterization of the ApxIII operons. *Infect. Immun.* **62**: 4411-4418.
18. **Gygi, D., J. Nicolet, C. Hughes, and J. Frey.** 1992. Functional analysis of the Ca(2+)-regulated hemolysin I operon of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect. Immun.* **60**: 3059-3064.
19. **Frey, J., M. Beck, U. Stucki, and J. Nicolet.** 1993. Analysis of hemolysin operons in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Gene.* **123**: 51-58.
20. **Schaller, A., R. Kuhn, P. Kuhnert, J. Nicolet, T. J. Anderson, J. I. MacInnes, R. P. Segers, and J. Frey.** 1999. Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology.* **145**: 2105-2116.
21. **Inzana, T.J., J. Ma, T. Workman, R. P. Gogolewski, and P. Anderson.** 1988. Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.* **56**: 1880-1889.
22. **Ward, C. K., M. L. Lawrence, H. P. Veit, and T. J. Inzana.** 1998. Cloning and mutagenesis of a serotype-specific DNA region involved in encapsulation and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5a: concomitant expression of serotype 5a and 1 capsular polysaccharides in recombinant *A. pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect. Immun.* **66**: 3326-3336.
23. **Ward, C. K., and T. J. Inzana.** 1997. Identification and characterization of a DNA region involved in the export of capsular polysaccharide by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5a. *Infect. Immun.* **65**: 2491-2496.
24. **Rioux, S., C. Galarneau, J. Harel, M. Kobisch, J. Frey, M. Gottschalk, and M. Jacques.** 2000. Isolation and characterization of a capsule-deficient mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Microb. Pathog.* **28**: 279-289.
25. **Jacques, M.** 2004. Surface polysaccharides and iron-uptake systems of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can. J. Vet. Res.* **68**: 81-85.
26. **Prescott, Harley and Klein.** 1995. Microbiologie. p. 54-55. Seconde Édition, De Boeck Université, Bruxelles.
27. **Labrie, J., S. Rioux, M. M. Wade, F. R. Champlin, S. C. Holman, W. W. Wilson, C. Savoye, M. Kobisch, M. Sirois, C. Galarneau, and M. Jacques.** 2002. Identification of genes involved in biosynthesis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 O-antigen and biological properties of rough mutants. *J. Endotoxin. Res.* **8**: 27-38.
28. **Belanger, M., C. Begin, and M. Jacques.** 1995. Lipopolisaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infect. Immun.* **63**: 656-662.
29. **Thwaites, R. N., and S. Kadis.** 1991. Immunogenicity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* outer membrane proteins and enhancement of phagocytosis by antibodies to the proteins. *Infect. Immun.* **59**: 544-549.
30. **Bog, Y. S., L. O. Andersen, L. Bastholm, F. Elling, O. Angen, and P. M. Heegaard.** 2001. The transferrin receptor of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: quantitation of expression and structural characterization using a peptide-specific monoclonal antibody. *Vet. Microbiol.* **81**: 51-64.

31. **Bahrami, F., A. Ekins, and D. F. Niven.** 2003. Iron acquisition by *Actinobacillus suis*: identification and characterization of transferrin receptor proteins and encoding genes. *Vet. Microbiol.* **94**: 79-92.
32. **Tonpitak, W., S. Thiede, W. Oswald, N. Baltes, and G. F. Gerlach.** 2000. *Actinobacillus pleuropneumoniae* iron transport: a set of exbBD genes is transcriptionally linked to the *tbpB* gene and required for utilization of transferrin-bound iron. *Infect. Immun.* **68**: 1164-1170.
33. **Archambault, M., J. Labrie, C. R. Rioux, F. Dumas, P. Thibault, C. Elkins, and M. Jacques.** 2003. Identification and preliminary characterization of a 75-kDa hemin- and hemoglobin-binding outer membrane protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Can. J. Vet. Res.* **67**: 271-277.
34. **Mikael, L.G., P. D. Pawelek, J. Labrie, M. Sirois, J. W. Coulton, and M. Jacques.** 2002. Molecular cloning and characterization of the ferric hydroxamate uptake (*fhu*) operon in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology.* **148**: 2869-2882.
35. **Mikael, L.G., R. Srikumar, J. W. Coulton, and M. Jacques.** 2003. *fhuA* of *Actinobacillus pleuropneumoniae* encodes a ferrichrome receptor but is not regulated by iron. *Infect. Immun.* **71**: 2911-2915.
36. **Boekema B. K., J. P. Van Putten, N. Stockhofe-Zurwieden, and H. E. Smith.** 2004. Host cell contact-induced transcription of the type IV fimbria gene cluster of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **72**: 691-700.
37. **Stevenson, A., J. MacDonald, and M. Roberts.** 2003. Cloning and characterisation of type 4 fimbrial genes from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.* **92**: 121-134.
38. **Zhang, Y., J. M. Tennent, A. Ingham, G. Beddome, C. Prideau, and W. P. Michalski.** 2000. Identification of type 4 fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol.Lett.* **189**: 15-18.
39. **Utrera, V., and C. Pijoan.** 1991. Fimbriae in *A. pleuropneumoniae* strains isolated from pig respiratory tracts. *Vet.Rec.* **128**: 357-358.
40. **Negrete-Abascal, E., V. R. Tenorio, A. L. Guerrero, R. M. Garcia, M. E. Reyes, and M. de la Garza.** 1998. Purification and characterization of a protease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1, an antigen common to all the serotypes. *Can. J.Vet. Res.* **62**: 183-190.
41. **Negrete-Abascal, E., V. R. Tenorio, J. J. Serrano, C. Garcia, and M. de la Garza.** 1994. Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin and immunoglobulin A. *Can. J. Vet. Res.* **58**: 83-86.
42. **Sheehan, B. J., P. R. Langford, A. N. Rycroft, and J. S. Kroll.** 2000. [Cu, Zn]-superoxyde dismutase mutants of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae* are attenuated in infections of the natural host. *Infect. Immun.* **68**: 4778-4781.
43. **Langford, P. R., B. M. Loynds, and J. S. Kroll.** 1996. Cloning and molecular characterization of Cu,Zn superoxyde dismutase from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **64**: 5035-5041.
44. **Bossé, J. T., and J. I. MacInnes.** 1997. Genetic and biochemical analyses of *Actinobacillus pleuropneumoniae* urease. *Infect. Immun.* **65**: 4389-4394.

45. **Bossé, J. T., and J. I. MacInnes.** 2000. Urease activity may contribute to the ability of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to establish infection. *Can. J. Vet. Res.* **64**: 145-150.
46. **Baltes, N., W. Tonpitak, G. F. Gerlach, I. Hennig-Pauka, A. Hoffmann-Moujahid, M. Ganter, and H. J. Rothkotter.** 2001. *Actinobacillus pleuropneumoniae* iron transport and urease activity: effects on bacterial virulence and host immune response. *Infect. Immun.* **69**: 472-478.
47. **Nagy, Z., and M. Chandler.** 2004. Regulation of transposition in bacteria. *Res. Microbiol.* **155**: 387-398.
48. **West, N., and C. Tang.** 2000. Mobile Genes. *Microbiology Today.* **27**: 178-180.
49. **Goryshin, I. Y., and S. W. Reznikof.** 1998. Tn5 in vitro transposition. *J. Biol. Chem.* **273**: 7367-7374.
50. **Merlin, C., and A. Toussaint.** 1999. Les éléments transposables bactériens. *Société Française de Génétique.* **15**: 1-13.
51. **Dennis, J. J., and G. J. Zylstra.** 1998. Plasmids: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2710-2715.
52. **Alexeyev, M. F., I. N. Shokolenko, and T. P. Croughan.** 1995. New mini-Tn5 derivatives for insertion mutagenesis and genetic engineering in gram-negative bacteria. *Can. J. Microbiol.* **41**: 1053-1055.
53. **de Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik, and K. N. Timmis.** 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 6568-6572.
54. **Tascon, R. I., E. F. Rodriguez-Ferri, C. B. Gutierrez-Martin, I. Rodriguez-Barbosa, P. Berche, and J. A. Vazquez-Boland.** 1993. Transposon mutagenesis in *Actinobacillus pleuropneumoniae* with a Tn10 derivative. *J. Bacteriol.* **175**: 5717-5722.
55. **Alexeyev, M. F., and I. N. Shokolenko.** 1995. Mini-Tn10 transposon derivatives for insertion mutagenesis and gene delivery into the chromosome of gram-negative bacteria. *Gene.* **160**: 59-62.
56. **Ojha, S., M. Sirois, and J. I. MacInnes.** 2005. Identification of *Actinobacillus suis* genes essential for the colonization of the upper respiratory tract of swine. *Infect. Immun.* **73**: 7032-7039.
57. **Fuller, T. E., S. Martin, J. F. Teel, et al.** 2000. Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence genes using signature-tagged mutagenesis in a swine infection model. *Microb. Pathog.* **29**: 39-51.
58. **Hoffman, L. M., J. J. Jendrisak, R. J. Meis, I. Y. Goryshin, and S. W. Reznikof.** 2000. *Transposome insertional mutagenesis and direct sequencing of microbial genomes.* *Genetica.* **108**: 19-24.
59. **Shea, J. E., J. D. Santangelo, and R. G. Feldman.** 2000. Signature-tagged mutagenesis in the identification of virulence genes in pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**: 451-458.
60. **Hensel, M., J. E. Shea, C. Gleeson, M. D. Jones, E. Dalton, and D. W. Holden.** 1995. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science.* **269**: 400-403.

61. **Sheehan, B. J., J. T. Bossé, A. J. Beddek, A. N. Rycroft, J. S. Kroll, and P. R. Langford.** 2003. Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* genes important for survival during infection in its natural host. *Infect. Immun.* **71**: 3960-3970.
62. **Hoffman, L. M. and J. J. Jendrisak.** 2002. Transposomes: a system for identifying genes involved in bacterial pathogenesis. *Methods Enzymol.* **358**:128-140.